Sara Lucas Silva

Licenciatura em Ciências da Engenharia Biomédica

Efeitos no esmalte dentário de produtos branqueadores contendo flúor

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Biomédica

Orientador: Professora Doutora Alda Sofia de Sousa Moreno, Professora Auxiliar Convidada, FCT-UNL

Co-orientador: Professor Doutor João Miguel Lourenço Silveira, Professor Auxiliar, FMDUL

Júri:

Presidente: Doutora Célia Maria Reis Henriques

Arguente: Doutora Ana Filipa Marques Chasqueira

Vogal: Doutora Alda Sofia Pessanha de Sousa Moreno

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2018

Estudo dos efeitos no esmalte dentário de produtos branqueadores contendo flúor

Ao meu pai

Agradecimentos

À minha orientadora Professora Doutora Sofia Pessanha pela partilha de conhecimentos, apoio, paciência, disponibilidade para esclarecer dúvidas e por toda a orientação concedida.

Ao meu co-orientador Professor Doutor João Silveira, por toda a ajuda disponibilizada.

À Professora Doutora Micaela Fonseca, pelo acompanhamento incansável durante as medições de PIGE e pelo engenho para encontrar soluções para os problemas enfrentados.

Ao professor João Amaral, Andreia Luís e Carlota Mendonça, pelo apoio na Faculdade de Medicina Dentária.

Ao professor João Cruz, Jorge Rocha e Hélio Luís, pelo auxílio prestado no Instituto Tecnológico e Nuclear.

À minha família, por me motivar sempre a não desistir e manter o otimismo. Em especial, ao meu pai, a quem dedico este trabalho.

Aos companheiros que mais me incentivaram durante este percurso: Cláudia Alves, João Pedro Borrego, André Rodrigues, Helena Pereira, Cristiana Fernandes, Sara Mendes, Cláudia Gonçalves e Carlos Pombo.

A todos os que estiveram presentes, obrigada.

Resumo

Os produtos de branqueamento dentário estão associados a alterações no conteúdo mineral do esmalte. No sentido de minimizar a desmineralização, têm surgido no mercado produtos que advogam a incorporação de flúor (F), responsável por diminuir a solubilidade da hidroxiapatite (HAp) constituinte do esmalte e aumentar a resistência à erosão dentária. Não existindo estudos que relacionem simultaneamente a assimilação de flúor, as alterações da dureza e as variações a nível molecular e elementar do esmalte, o presente estudo propõe-se a quantificar de forma mais abrangente o potencial protetor do flúor no contexto do branqueamento dentário, comparando o efeito de produtos com e sem este elemento através de: quantificação da incorporação de F por emissão gama induzida por protões (PIGE); avaliação da variação na estrutura cristalina da HAp por via da determinação da razão de despolarização do pico de alongamento simétrico do fosfato (PO_4^{3-}) nos espectros de Raman; variações de dureza pelo teste de microdureza de Vickers; e avaliação das variações do número atómico efetivo do esmalte através da razão entre intensidade dos picos de dispersão Compton e Rayleigh do elemento do ânodo nos espectros de espectroscopia de raios X dispersiva em energia (EDXRF).
O estudo envolveu a utilização de 40 amostras de esmalte humano hígido divididas aleatoriamente por 4 grupos, sujeitos ao protocolo de branqueamento de um produto com peróxido de carbamida (PC) ou peróxido de hidrogénio (PH) como agentes ativos: (A) Opalescence 16% PC com flúor, (B) Paint On Plus 6% PH sem flúor, (C) Opalescence 6% PH com flúor e (D) VivaStyle 16% PC. Um quinto grupo (AP), constituído por 10 amostras polidas, foi sujeito a branqueamento por Opalescence 16%PC com flúor. As amostras foram conservadas em saliva humana entre aplicações. Todos os grupos foram analisados antes e após tratamento por espectroscopia Raman. Os grupos sujeitos a produtos fluoretados (A, C e AP) e um grupo de controlo negativo (D) foram analisados por PIGE. O grupo AP foi analisado pelo teste de Vickers. A avaliação da razão Rayleigh/Compton por EDXRF foi realizada em amostras de esmalte numa fase pré-branqueamento e considerada inconclusiva.
A utilização dos produtos de branqueamento contendo flúor provocou um aumento da concentração deste elemento no tecido e a diminuição da razão de despolarização do esmalte, indicando aumento da mineralização superficial. De entre os produtos sem flúor, o estado de mineralização manteve-se inalterado com o produto Vivastyle e aumentou sob o efeito do produto Paint On Plus. O polimento do esmalte, necessário para aplicação do teste de Vickers, conduziu ao aumento da suscetibilidade à erosão, traduzida pela diminuição da dureza e aumento da razão de despolarização.
O resumo não usa abreviaturas. As mesmas são apenas definidas mais tarde na introdução

Palavras-chave: branqueamento dentário, flúor, desmineralização dentária, espectroscopia Raman confocal, emissão gama induzida por protões (PIGE), teste de microdureza de Vickers, espetroscopia por fluorescência de raios-X dispersiva em energia (EDXRF)

Abstract

Teeth whitening products are associated with changes in enamel mineral content. In order to minimize demineralization, products that promote the incorporation of fluorine (F) have appeared in the market, responsible for decreasing the solubility of the hydroxyapatite (HAp) in enamel and to increase dental erosion resistance. Considering the absence of studies comparing simultaneously fluoride assimilation, changes in hardness and variations at the molecular and elemental level of enamel, the present study proposes to more comprehensively quantify the protective potential of fluoride in the context of tooth whitening, comparing the effect of products with and without the element by: evaluating F incorporation by proton-induced gamma emission (PIGE); analyzing the variation in the crystalline structure of the HAp via the depolarization ratio of the symmetric stretching peak of phosphate (PO_4^{3-}) in μ-Raman spectra; measuring enamel hardness by Vickers microhardness test; and evaluating the changes in the effective atomic number of the enamel through the ratio between the intensity of the Compton and Rayleigh scattering peaks in the energy dispersive X-ray spectroscopy (EDXRF) spectra.

The study involved the use of 40 samples of intact human enamel, randomly divided into 4 groups (A, B, C e D), each subject to the bleaching protocol of a product with carbamide peroxide (CP) or hydrogen peroxide (HP) as active agents: (A) Opalescence 16%PC with fluoride, (B) Paint On Plus 6% PH, (C) Opalescence 6%PH with fluoride e (D) VivaStyle 16% PC. A fifth group (AP) of polished enamel samples was also subject to Opalescence 16% CP with fluoride. Samples were stored in human saliva between applications. All groups were analyzed before and after bleaching by Raman spectroscopy. The groups subject to fluoridated products (A, C and AP) and a negative control group (D) were analyzed by PIGE. Group AP was analyzed by Vickers microhardness test. The EDXRF study was found inconclusive and abandoned during control analysis.

The use of fluoride-containing bleaching products caused an increase in the concentration of this element in the tissue and led to enamel remineralization, manifested by the decrease in the depolarization ratio. Among the products without fluoride, the state of mineralization remained unchanged after exposure to Vivastyle 16% and increased with the product Paint On Plus. Enamel polishing, required for application of the Vickers test, led to increased susceptibility to erosion, resulting in decreased hardness and increased enamel depolarization ratio.

Keywords: tooth bleaching, fluoride, dental erosion, confocal Raman spectroscopy, particle induced gamma emission (PIGE), Vickers microhardness test, energy dispersive x-ray fluorescence (EDXRF)

Conteúdo

Índice de Figuras

Índice de Tabelas

Lista de Símbolos

a	Partícula projétil
A	Núcleo alvo
A_c	Área de contacto de indentação
b	Partícula projétil após colisão com rearranjo
B	Núcleo alvo após colisão com rearranjo ou captura radiativa
d	Espessura de um material
d_1	Diagonal de indentação do indentador de Vickers
d_2	Diagonal de indentação do indentador de Vickers
e	Carga do eletrão
E	Campo elétrico
E_0	Amplitude máxima do campo elétrico
E_b	Energia de bombardeamento
E_r	Energia de ressonância
f_i	Fração isótopica
f_m	Fração mássica
h_{final}	Profundidade residual de indentação
h_{max}	Profundidade máxima de indentação
I	Intensidade de radiação
I_0	Intensidade de radiação inicial
K_α	Riscas mais intensas da série K do espetro descontínuo de raios-X
N	Número de partículas alvo por unidade de área
p	Protão
P	Carga aplicada
q	Deslocamento molecular
q_0	Amplitude do deslocamento molecular
Q	Carga coletada
R	Taxa de produção de partículas gama
R/C	Razão Rayleigh/Compton
S	Poder de paragem
t	Tempo
v_0	Frequência de vibração da radiação incidente
v_1	Modo vibracional de elongação simétrica do fosfato
v_{vib}	Frequência de vibração
W	Distribuição angular
Y	Rendimento
x	Distância percorrida num material
Z	Número atómico

Z_{ef}	Número atómico eficaz
α	Tensor de polarizabilidade molecular
ϵ	Secção eficaz de paragem
Φ	Ângulo de dispersão de partículas
γ	Radiação gama
Ω	Ângulo sólido
ρ	Razão de despolarização
β	Momento dipolar induzido
σ	Secção eficaz
θ	Ângulo de dispersão de partículas
μ	Coeficiente de atenuação linear
Γ	Espessura de um filme

Lista de acrónimos e Siglas

µ-Raman	Micro-Raman
ACP	Do inglês *Amorphous Calcium Phosphate*
APF	Do inglês, *Acidulated Phosphate Fluoride*
CCD	Do inglês *Charge Coupled Devices*
EDXRF	Do inglês *Energy Dispersive X-Ray Fluorescence*
ERYA	Do inglês**.** *Emitted Radiation Yield Analysis*
FAp	Fluoropatite
FMDUL	Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa
FT-Raman	Do inglês *Flourier Transform-Raman*
GIBBO	Grupo de Investigação de Biologia e Bioquímica Oral
HAp	Hidroxiapatite
HBS	Do inglês *Hunter Schreger Bands*
HFAp	Hidroxiapatite fluoretada
HPGe	Do inglês *High Purity Germanium*
KHN	Do inglês *Knoop Hardness Number*
LASER	Do inglês *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*
LED	Do inglês *Light Emitting Diode*
LibPhys	Laboratório de Instrumentação, Engenharia Biomédica e Física das Radiações.
MEV	Microscopia Eletrónica de Varrimento
PBS	Perborato de sódio
PC	Peróxido de carbamida
PDL	Do inglês *Periodontal Ligament*
PF	Do inglês *Potassium Nitrate and Fluoride*
pH	Potencial de hidrogénio
PH	Peróxido de hidrogénio
PIGE	Do inglês *Particle Induced Gamma Emission*
PIXE	Do inglês *Particle-induced X-ray Emission*
SSD	Do inglês *Silicon Drift Detector*
VHN	Do inglês, *Vickers Hardness Number*
XRF	Do inglês *X-Ray Fluorescence*

1. Introdução

A beleza e a harmonia estética são conceitos que sempre influenciaram o ser humano. Um sorriso bonito, com dentes brancos e alinhados, é um dos principais padrões de beleza da sociedade atual. O branqueamento dentário é, por isso, uma das áreas que mais cresce na cosmética e Medicina Dentária [1]. Contudo, a utilização frequente de agentes branqueadores sem as devidas condições de segurança acarreta riscos, entre os quais se incluem a desmineralização permanente do esmalte. Estes efeitos adversos são, muitas vezes, ignorados ou menosprezados pelo consumidor [2].

A cor dentária é definida pelas tonalidades do esmalte e da dentina. A cor branca deve-se às propriedades óticas do esmalte, que reflete a luz incidente quase por completo, sem absorção diferenciada dos comprimentos de onda [3]. A cor é essencialmente dada pela dentina. O esmalte é translucido com um índice de refração perto de 1 pelo que não reflete quase luz nenhuma. O escurecimento do dente está relacionada com a formação de cadeias moleculares longas e complexas no interior da estrutura dentária, responsável pelo aumento do seu índice de absorção de luz [4]. Os branqueadores dentários geram reações de oxidações-redução em que há libertação de radicais livres, que desintegram estas moléculas em estruturas com cadeias moleculares mais pequenas. Há, assim, uma redução do número de constituintes cromóforos, levando à diminuição da absorção de luz e aumentando a luminosidade do dente [2] [5].

O branqueamento dentário pode ser realizado em consultório, em ambulatório, ou com branqueadores de venda livre, recorrendo a produtos contendo peróxido de hidrogénio (PH) e peróxido de carbamida (PC) como agentes ativos. Vário estudos sugerem que o branqueamento dentário pode induzir alterações morfológicas, mecânicas e químicas no esmalte, associadas ao efeito dos radicais livres [6]. Além disso, a inclusão de agentes ácidos na composição do branqueador para aumento da estabilidade do agente ativo cria um ambiente passível de induzir desmineralização do esmalte [7].

No sentido de ultrapassar estes efeitos nefastos, têm surgido no mercado produtos de branqueamento que advogam a incorporação de flúor no esmalte dentário. Os tratamentos com produtos fluoretados promovem a formação de uma camada superficial de fluoreto de cálcio (CaF_2) e a formação de hidroxiapatite fluoretada ($Ca_{10}(PO_4)_6F(OH)$) e fluoropatite ($Ca_{10}(PO_4)_8F_2$), levando à diminuição da solubilidade dos cristais de hidroxiapatite ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) do esmalte e aumentando a sua estabilidade e resistência à desmineralização causada por ácidos [8].

À data desta revisão literária, não existem estudos que relacionem simultaneamente a assimilação de flúor, as alterações a nível molecular e elementar e a dureza do esmalte. Assim, o presente estudo propõe-se a quantificar de forma mais abrangente o potencial protetor do flúor no contexto do branqueamento dentário, comparando o efeito de produtos com e sem o elemento por via das técnicas de micro-espetroscopia Raman (μ-Raman), espetroscopia por fluorescência

de raios X dispersiva em energia (EDXRF), espectroscopia de emissão gama induzida por protões (PIGE) e teste de microdureza de Vickers.

1.1 Pertinência do tema em Engenharia Biomédica e na especialidade

A Engenharia Biomédica é uma área que se propõe a desenvolver abordagens inovadoras para a prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças, fornecendo assim uma melhoria geral nos cuidados de saúde e no próprio conhecimento do corpo humano [9]. referencias aparecem antes do ponto final Dados os riscos associados à utilização de produtos branqueadores referencia parecem no final da frase e não no meio e o caráter irreversível da erosão dentária, a comprovação do efeito protetor da inclusão de flúor na desmineralização do esmalte dentário contribuiria positivamente para a preservação da saúde oral dos consumidores [6] [10]. A investigação neste tema possibilitará, assim, o desenvolvimento de novos conhecimentos na área da saúde e da odontologia.

1.2. Objetivos

1.2.1 Gerais

O presente estudo pretende avaliar o efeito protetor da inclusão de flúor em produtos de branqueamento dentário na desmineralização do esmalte através do estudo das alterações no conteúdo elementar e molecular na matriz de hidroxiapatite (HAp) do dente após branqueamento, recorrendo a técnicas analíticas não destrutivas.

1.2.2 Específicos

São objetivos específicos deste trabalho avaliar a incorporação de flúor no esmalte tratado com produtos branqueadores de peróxido de carbamida (PC) ou peróxido de hidrogénio (PH) fluoretados e comparar as modificações da composição do esmalte branqueado com e sem a inclusão de flúor (nitrato de potássio e fluoreto), através da análise de:

- Variação da concentração do flúor no esmalte por PIGE;
- modificação da razão de despolarização no esmalte como medida de alteração da estrutura cristalina da hidroxiapatite por μ -Raman confocal;
- variação da dureza do esmalte através do teste de microdureza de Vickers, num grupo experimental sujeito a polimento;
- alteração do número atómico efetivo (Z_{ef}) do esmalte por comparação dos picos de dispersão de Rayleigh e Compton do material do ânodo, no espetro de EDXRF, recorrendo a uma reta de calibração.

2. O dente

Cada dente humano é constituído por uma coroa com uma ou mais cúspides, colo e raiz. Cada dente pode ser descrito segundo quatro faces: vestibular (face virada para o exterior), palatina/lingual (face virada para o interior da cavidade bucal) e faces interproximais. Ao longo da coroa, destacam-se a região oclusal (mais próxima das cúspides) medial e cervical (mais próxima da raiz).

O centro do dente denomina-se cavidade pulpar e encontra-se preenchido por um aglomerado de vasos sanguíneos, nervos e tecido conjuntivo a que se designa polpa. A cavidade pulpar encontra-se rodeada pela dentina, um tipo de tecido celular semelhante ao osso. A dentina da coroa do dente é revestida por uma substância rígida e acelular designada esmalte, que protege o dente da erosão por ácidos e do desgaste mecânico. Na região da raiz, a superfície da dentina é revestida por cemento, um tipo de tecido conjuntivo mineralizado e avascular.

Os dentes estão enraizados em alvéolos, ao longo do processo alveolar. A fixação do dente deve-se aos ligamentos periodontais, que consistem em tecido conjuntivo fibroso que se estende pelas paredes alveolares e se liga ao cemento (figura 2.1) [11].

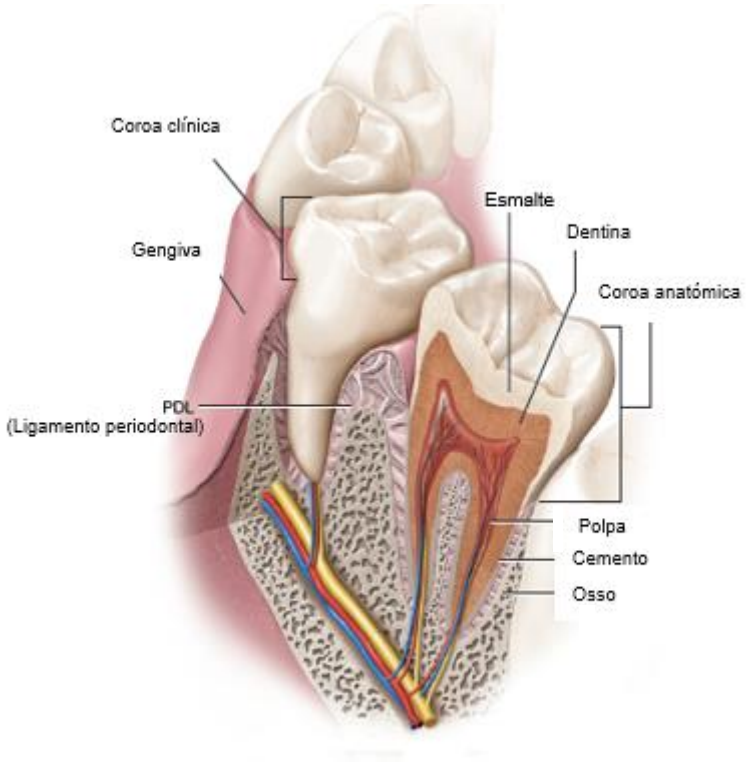

Figura 2.1-Representação da anatomia e estrutura de suporte do dente. Adaptado de [12].

2.1 O esmalte

O processo de formação do esmalte é designado amelogénese, levada a cabo pelos ameloblastos. Estas células cobrem toda a superfície do dente durante o seu desenvolvimento e desaparecem assim que o dente emerge na cavidade oral. A perda destas células resulta na exposição de uma matriz insensível que não pode ser regenerada ou substituída quando destruída, o que justifica a necessidade de adquirir um elevado nível de organização e mineralização [12].

2.1.1 Composição

O esmalte atua como protetor da coroa do dente, sendo constituído em mais de 96% por matéria inorgânica na forma de cristais de hidroxiapatite e elementos vestigiais de fluor, carbonato, magnésio, sódio, cloreto, potássio e zinco. Os restantes 4% englobam matéria orgânica e água [12].

Apesar de constituir tecido morto do ponto de vista biológico, o esmalte é permeável e permite a ocorrência trocas iónicas com ambiente da cavidade bucal, em particular a saliva. A molécula de hidroxiapatite, de fórmula química $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, é suscetível à substituição do catião Ca^{2+} por K^+ , Na^+, NH_4^+, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+} ou Zn^{2+}, e do grupo OH^- e PO_4^{3-} por CO_3^{2-}, SO_4^{4-}, SO_4^{2-}, Cl^-e F^- [13] [12].

A substituição dos iões acarreta alterações das propriedades da apatite: a substituição por F^- diminui a solubilidade dos cristais, a substituição por CO_3^{2-} aumenta-a, e o magnésio inibe o crescimento do cristal. Contudo, a configuração estrutural mantém-se quase inalterada após a substituição e absorção destes iões [12].

A porção orgânica do esmalte é constituída maioritariamente por proteínas e localiza-se na periferia e entre os cristais de HAp [3]. Estas camadas orgânicas tornam o esmalte semi-permeável e permitem a passagem de pequenas moléculas, tais como os peróxidos constituintes dos branqueadores dentários, do esmalte para a polpa. De facto, é a existência da matéria orgânica que propicia o branqueamento, permitindo a difusão dos agentes ativos mesmo na ausência de fissuras no esmalte [14]. O branqueamento dentário pode, contudo, resultar na disrupção destas proteínas, com consequente perda de cristais de HAp [15][16].

2.1.2 Estrutura e propriedades

A molécula de hidroxiapatite tem geometria hexagonal e a repetição do composto permite a formação de cristais de diferentes tamanhos. Os cristais organizam-se em grupos, adotando uma forma prismática. Os prismas têm aproximadamente 6 μm de diâmetro e até 2,5 mm de comprimento, radiando da junção amelodentinária até à superfície do esmalte. Ao esmalte localizado entre os prismas dá-se o nome de interprismático [3].

No esmalte prismático, os prismas estão organizados em camadas com diferentes orientações. Esta variação periódica de direção produz o fenómeno ótico designado por bandas Hunter Schreger (HSB), que está relacionado com as diferentes propriedades refrativas dos prismas em camadas adjacentes (figura 2.2) [3].

O esmalte prismático constitui a camada mais interna do esmalte. A camada mais superficial é constituída por esmalte aprismático, em que os cristais se encontram alinhados paralelamente entre si. Esta porção de esmalte é altamente mineralizada devido à ausência de fronteira entre prismas, onde se deposita grande quantidade de matéria orgânica [3]. Estima-se que o esmalte aprismático abranja os primeiros 30 μm de profundidade do dente [17] [18].

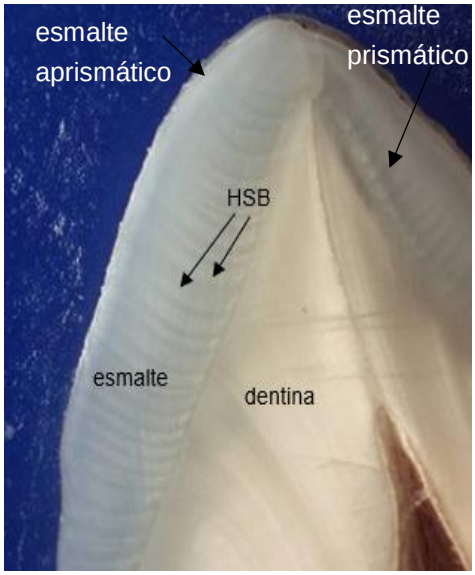

Figura 2.2-Fotografia da secção longitudinal de um pré-molar, exibindo esmalte com HSB e a dentina. [19]

Devido a esta elevada mineralização, o esmalte é o tecido biológico mais rígido do corpo humano, tolerando eficazmente forças de impacto e corte. Apesar de possuir uma baixa força de compressão e ser frágil, possui um módulo de elasticidade elevado. Este fator, juntamente com o suporte flexível da dentina, minimiza o risco de fratura [3].

Contudo, as propriedades mecânicas variam ao longo da profundidade esmalte, sendo a sua superfície mais rígida, densa e menos porosa que o seu interior [3]. Em temos de solubilidade, verifica-se que a suscetibilidade a ácidos externos e a velocidade de dissolução do fosfato na sub-superfície do esmalte são superiores à da superfície externa [20]. Este facto está parcialmente relacionado com o facto de ser na região superficial que o ião F^- é preferencialmente incorporado [21].

Relativamente às propriedades óticas, o esmalte consiste num material cristalino birrefringente, refletindo a luz de forma distinta em diferentes direções. O esmalte recente é mais claro porque, apesar de a luz o penetrar imediatamente, é quase completamente refletida internamente, sem absorção diferenciada dos comprimentos de onda. Com a idade, o esmalte torna-se mais translúcido e as cores da dentina começam a ser transmitidas, resultando numa cor amarelada [3].

3. Erosão dentária

A erosão dentária é o processo através do qual os tecidos dentários duros são destruídos pela ação de um ácido de natureza endógena ou exógena, sem a intervenção de microrganismos. Enquanto que a cárie dentária decorre da desmineralização da camada mais interna do esmalte, a erosão é um fenómeno de superfície, envolvendo uma dissolução mais rápida e abrangente e conduzindo à perda progressiva do esmalte a longo prazo [3] [16].

3.1 Efeito do pH na erosão do esmalte

A dissolução da hidroxiapatite em solução aquosa ocorre através seguinte reação:

$$\mathrm{Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2} \leftrightarrow 10\mathrm{Ca^{2+}} + 6\mathrm{PO_4^{3-}} + 2\mathrm{OH^-} \tag{3.1}$$

A reação prossegue até a solução se encontrar saturada, relativamente à HAp. Nesta altura, a reação no sentido direto (dissolução) encontra-se em equilíbrio com a reação no sentido inverso (precipitação). A diminuição de qualquer um dos iões deste produto perturba o estado de saturação da solução, conduzindo a reação no sentido da dissolução [10].

As soluções ácidas caracterizam-se pela elevada concentração de iões de hidrogénio. Estes iões removem $O\mathrm{H^-}$ para formar água, através da expressão:

$$\mathrm{H^+} + \mathrm{OH^-} \leftrightarrow \mathrm{H_2O} \tag{3.2}$$

O produto de solubilidade da água é uma constante de valor 10^{-14} $(\mathrm{mol/L})^2$, correspondente ao produto das concentrações do ião hidrogénio e hidróxido, $[H^+][OH^-]$. Assim, quando $[H^+]$ aumenta nas soluções ácidas, $[OH^-]$ irá diminuir reciprocamente.

Por outro lado, o fosfato inorgânico presente na saliva encontra-se em quatro formas diferentes, $\mathrm{H_3PO_4}$, $\mathrm{HPO_4^{2-}}$, $\mathrm{H_2PO_4^-}$ e $\mathrm{PO_4^{3-}}$, estando a concentração das quatro espécies dependente do pH (figura 3.1). Quanto menor o pH, menor a concentração de $\mathrm{PO_4^{-2}}$, que é o único ião a contribuir para a formação da HAp [10].

Sabe-se que a desmineralização do esmalte ocorre para valores de pH inferiores a cerca 5,5, podendo este valor variar consoante a concentração de iões cálcio e fosfato em solução. Se o pH de uma solução for inferior a este valor crítico, a solução encontra-se insaturada pela HAp e o esmalte terá tendência a dissolver-se, até se atingir a saturação [10] [16].

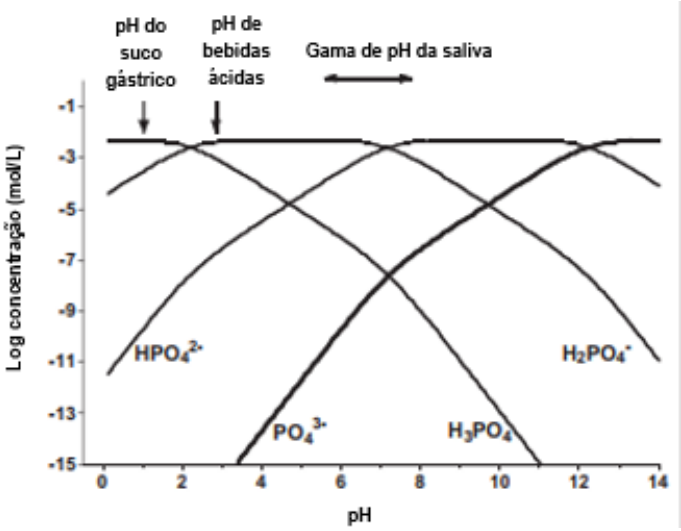

Figura 3.1-Comparação da concentração de várias espécies de fosfato inorgânico com o pH, na saliva contendo uma concentração total de fosfato de 5 x 10^{-3} mol/L. Há uma diminuição significativa da concentração de PO_4^{3-} a baixo pH. Adaptado de [8]..

A saliva é um elemento importante para a menorização dos efeitos dos agentes ácidos sobre o esmalte. A sua composição em cálcio, fosfato e o flúor contribuem para a reposição dos iões perdidos durante a erosão. Por outro lado, os componentes orgânicos promovem a formação de uma película superficial protetora, constituída por proteínas salivares, que promove a difusão do cálcio e fosfato para remineralização. O bicarbonato e o fosfato presentes na saliva levam a que esta assuma igualmente a função de solução tampão, contrariando o decréscimo do pH [22][23].

Após um limiar de erosão por ação de ácidos, o esmalte não pode ser remineralizado. Ao contrário do esmalte danificado por cárie, em que a desmineralização é na sub-superfície e se mantém uma camada intacta de esmalte superficial, o esmalte fortemente erodido perde a matriz necessária para o crescimento dos cristais. A superfície do esmalte atacada por ácidos adquire uma película bacteriana que inibe a deposição mineral, mesmo em condições de imersão em saliva supersaturada em relação aos elementos constituintes do dente [10]. É, por isso, fundamental prevenir a exposição do esmalte dentário a produtos de baixo pH ou proteger o dente numa altura em que a remineralização ainda é possível, pela inclusão de elementos como o flúor.

3.2 Efeito do flúor na erosão do esmalte

O efeito do flúor na redução da incidência de cárie e da erosão é bem conhecido. Quando se aplicam no esmalte soluções de flúor em baixa concentração, os iões de F^- substituem OH^- na HAp, formando hidroxiapatite fluoretada (FHAp) e fluoropatite (FAp). Na presença de uma concentração elevada de flúor, é promovida a formação de uma camada de fluoreto de cálcio (CaF_2) nos dentes (figura 3.2) [8].

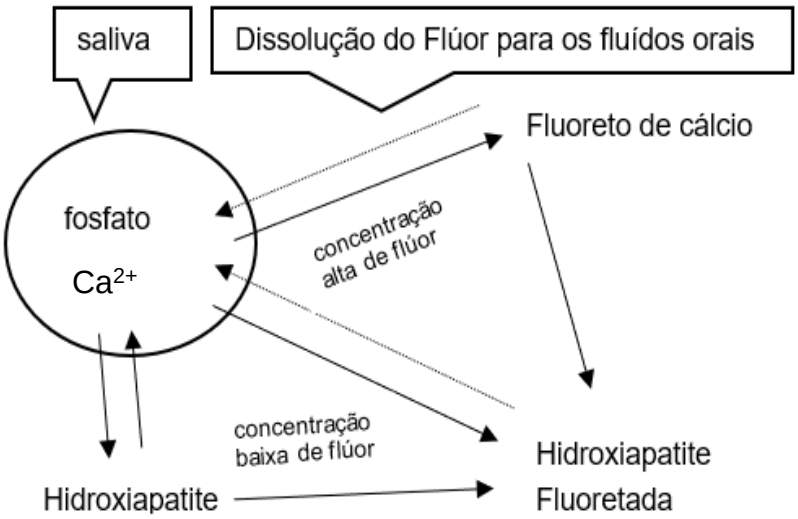

Figura 3.2-Esquema representativo das reações químicas relevantes para os processos de tratamento de cáries envolvendo flúor. Adaptado de [10].

O raio atómico do F^- é pequeno o suficiente para permitir que o ião ocupe a posição mais simétrica possível na lacuna deixada pelo OH^- na estrutura da hidroxiapatite [16]. A subsequente formação de hidroxiapatite fluoretada e fluoropatite no esmalte resulta num cristal mais estável e de menor solubilidade [24]. Um mineral com baixa solubilidade irá precipitar mais rapidamente em contacto com soluções contendo cálcio e fosfato, pelo que a incorporação de flúor atua como catalisador do processo de remineralização [8][25].

O pH de desmineralização da fluoropatite (4,5) é significativamente inferior ao da hidroxiapatite (5,5), permitindo diminuir a suscetibilidade à erosão em ambientes de baixo pH [26]. Além disso, na presença de flúor, a saliva encontra-se supersaturada em relação a FAp para a maioria dos valores de pH fisiológico, enquanto que a supersaturação relativamente a HAp se restringe a valores superiores a 5,5. Este facto torna bastante favorável a precipitação de FAp, na presença do ião F^- [27]. Contudo, para a formação de FHAp são necessários 10 iões de Ca e 6 iões fosfato, razão pela qual surgem frequentemente na composição de produtos branqueadores substâncias ricas em cálcio e fosfato [28].

Por sua vez, a formação de uma camada de CaF_2 e a sua posterior dissolução permite a difusão do flúor para o esmalte, saliva, ou placa bacteriana que cobre o dente, de uma forma gradual. Esta camada funciona, assim, como reservatório de iões F^- para a formação de FAp e FHAp, atuando como protetor do esmalte durante longos períodos de tempo [29].

Verifica-se, além disso, que o esmalte tratado com soluções ácidas fluoretadas revelam inclusão de maior concentração de flúor a maior profundidade, relativamente a soluções básicas ou alcalinas. [24] Este efeito está relacionado com a dissolução rápida dos cristais de apatite em baixo pH, que aumenta a concentração de iões de Ca e facilita a deposição de CaF_2.[30] Verifica-se também que o esmalte erodido tem maior capacidade de armazenas CaF_2 relativamente ao

esmalte intacto, pois o aumento da área superficial causada pela desmineralização aumenta o número de possíveis locais de retenção de flúor [31][16].

O flúor assume ainda um papel protetor sobre cáries, que está relacionado com o ataque bacteriano. O flúor reage com iões H^+ para formar HF, capaz de aumentar a permeabilidade das membranas celulares bacterianas, penetrar no interior celular e inibir enzimas celulares, conduzindo à diminuição da produção de ácidos [32].

4. Branqueamento dentário

Ao longo dos últimos 2000 anos, têm sido empregues várias tentativas de branquear os dentes recorrendo a vários produtos biológicos e químicos. O branqueamento de dentes vitais (dentes não desvitalizados) foi introduzido em 1877 por Chappel e permaneceu como um tratamento de consultório durante vários décadas [33]. Os tratamentos *at home* iniciaram-se apenas em 1968, com a descoberta do potencial branqueador do anti-séptico oral *Gly-oxide* por Klusmier. Em 1988, este produto foi substituído clinicamente por *Proxigel* (mistura de 10% peróxido de carbamida, água, glicerina e carbopol) e um ano mais tarde iniciou-se a comercialização do produto *White and Bright*™, impulsionando fortemente a indústria do branqueamento dentário [16].

Encontramo-nos atualmente na terceira geração de produtos de branqueamento. A primeira incluiu produtos em forma líquida, que iam perdendo componentes ativos e exigiam reabastecimento. A segunda geração introduziu branqueadores viscosos, na forma de gel, que permitia a retenção e aderência ao dente. A terceira geração distingue-se pela variedade de concentrações de agentes ativos e pela incorporação de elementos dessensibilizantes e preventivos da erosão dentária, como o flúor [34].

4.1 Pigmentação dentária

Qualquer intervenção a nível do esmalte, dentina ou polpa resulta numa alteração da coroa, devido às suas propriedades óticas de transmissão e reflexão de luz. Dentro dos padrões normais, a cor dentária é definida pelas tonalidades azul, verde e rosa do esmalte e pelas tonalidades amarela/castanha da dentina [35]. O escurecimento do dente está relacionada com a formação de cadeias moleculares longas e complexas no interior da estrutura dentária, responsável pelo aumento do seu índice de absorção de luz [4].

O reconhecimento correto do tipo de descoloração dentária tem grande importância na seleção do tratamento adequado. Habitualmente, a pigmentação é classificada de acordo com a origem do pigmento, podendo ser dividida em intrínseca, extrínseca e internalizada [36].

A pigmentação intrínseca é o resultado de alterações que ocorrem a nível da estrutura dos tecidos dentários. Estas podem ter origem pré-eruptiva, surgindo durante a amelogénese, ou pós-eruptiva, estando relacionadas com a idade ou com lesões. A descoloração pode derivar de causas sistémicas, relacionados com a toma de tetraciclinas (antibiótico), fluorose e doenças genéticas, ou causas locais, como a ocorrência de necrose pulpar, hemorragia intrapulpar e reabsorção radicular [36].

Na pigmentação internalizada, a pigmentação é incorporada na estrutura do dente após o desenvolvimento dentário. Ocorre em defeitos de esmalte e na superfície permeável da dentina

exposta. Os pigmentos são incorporados por via de anomalias de desenvolvimento ou anomalias adquiridas (cáries, desgaste dentário, materiais restauradores) [3].

Na pigmentação extrínseca, os pigmentos são depositados na superfície dentária ou na placa bacteriana. Esta pigmentação é considerada indireta se estiver associada a anti-sépticos orais catiónicos e a sais metálicos e direta se tiver origem em pigmentos provenientes da dieta alimentar, tais como vinho tinto, chá e café [3]. Os taninos presentes nestas bebidas estabelecem pontes de hidrogénio com as proteínas salivares que, por sua vez, se ligam à superfície do dente por pontes de cálcio, formando uma película que reveste o esmalte (figura 4.1). Com o passar do tempo e na ausência de correta higiene oral, estas manchas tornam-se persistentes e escurecem, só podendo ser eliminado por métodos de branqueamento [37].

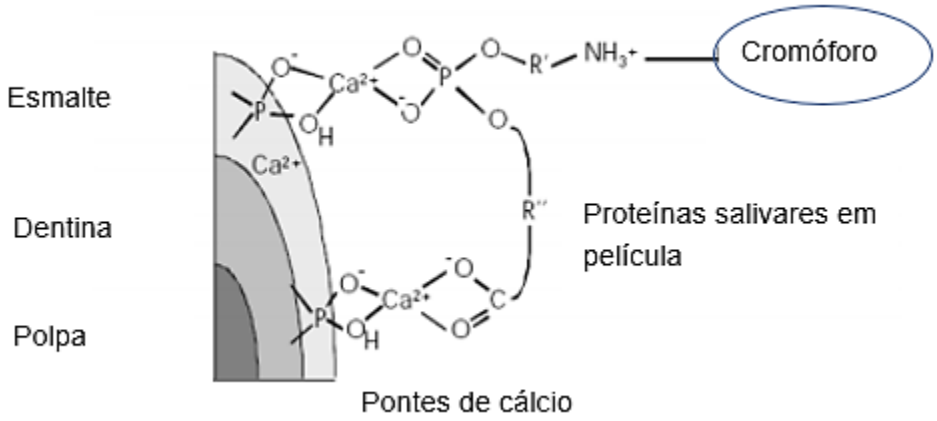

Figura 4.1-Representação do mecanismo de adesão das substâncias cromóforas (taninos) à superfície do dente. Adaptado de [16].

4.2 Composição dos agentes branqueadores

Dependendo da técnica de branqueamento existem diferentes agentes branqueadores, empregues em diferentes percentagens, entre os quais o peróxido de hidrogénio (PH), peróxido de carbamida (PC), perborato de sódio (PBS) e ácido clorídrico (HCl). Os primeiros dois agentes são os mais utilizados, surgindo geralmente em concentrações de 1,5-10% e 30-35% de PH e 10-20%e 30-35% de PC [5].

Para além dos agentes ativos, os branqueadores incluem outros componentes, entre os quais:

- Espessantes, como o carbopol, que permite a libertação lenta de oxigénio e aumenta a viscosidade e estabilidade do agente branqueador;
- Excipientes, como a glicerina, que facilitam a manipulação dos branqueadores e permitem dissolver outros ingredientes;
- Surfactantes, para facilitar a difusão da substância ativa para o dente;

- Conservantes como o metil, propilparabeno e benzoato de sódio, que visam minorar a proliferação bacteriana e promover a libertação de metais de transição, como o magnésio e o ferro, que aceleram a decomposição do peróxido de hidrogénio;
- Aromatizantes, com o objetivo de tornar o produto mais agradável ao consumidor;
- Ureia, que eleva e estabiliza o pH da solução, induz efeitos anti-cariogénicos e estimula a produção de saliva;
- Dessensibilizantes, como o flúor, nitrato de potássio e fosfato de cálcio amorfo (ACP), que reduzem a sensibilidade dentária [6] [34].

4.3 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação dos agentes químicos num branqueamento dentário depende de como o agente ativo interage com as moléculas do pigmento. Agentes branqueadores como o peróxido de carbamida e o peróxido de hidrogénio possuem um baixo peso molecular e a propriedade de desnaturar proteínas, aumentando o movimento de iões através da estrutura dentária e, consequentemente, promovendo condições de reatividade [4].

Em termos de concentração de princípio ativo, um produto de concentração 10% PC é o equivalente a 3,5% PH [38]. Os dois agentes distinguem-se pelo ritmo de dissociação de peróxidos: o PH dissocia-se quase imediatamente sob a influência de luz ou calor, enquanto o PC se decompõem lentamente, ao longo de várias horas. Devido a esta diferença de ritmo, o PH acarreta mais riscos, relativamente à mesma concentração de PC [39][16].

4.3.1 Peróxido de hidrogénio

Quando aplicado na superfície do dente, o peróxido de hidrogénio decai sob influência do aumento de temperatura, alterações de pH ou pela presença de catalisadores, tais como os iões metálicos originários de depósitos dentários ou enzimas presentes na saliva (peroxidases e catalases) [40]. Desta reação resultam radicais livres como HO_2^* (hidroperoxil), HO* (radical hidroxilo), O_2* (superóxido) ou HOO* (radical hidroperoxil), originados por [16]:

$$(A)\mathrm{H_2O_2} \rightarrow 2\mathrm{HO}^* \tag{4.1}$$

$$\mathrm{HO}^* + \mathrm{H_2O_2} \rightarrow \mathrm{H_2O} + \mathrm{HO_2^*} \tag{4.2}$$

$$\mathrm{HO_2^*} \leftrightarrow \mathrm{H}^+ + \mathrm{O_2^{*-}} \tag{4.3}$$

$$(B)\mathrm{H_2O_2} \leftrightarrow \mathrm{H}^+ + \mathrm{HOO}^- \tag{4.4}$$

Os radicais livres têm capacidade de se difundir através de microporos do esmalte até à dentina. Devido à sua grande afinidade para ligações insaturadas dos hidrocarbonetos, quebram as duplas ligações que existem entre as moléculas dos pigmentos, conduzindo à sua desintegração. Da reação resultam, ora moléculas de cadeias moleculares mais pequenas, ora

dióxido de carbono e água, que são removidos por difusão. A redução da cadeia molecular resulta em moléculas com constituintes menos pigmentados e conduz ao desvio do seu espectro de absorção, aumentando, desta forma, a luminosidade do dente [5] [2].

Quando o branqueamento atinge o seu ponto de saturação, o agente branqueador começa a atuar noutros compostos que apresentam cadeias de carbono, como as proteínas da matriz do esmalte (*overbleaching*). Assim, é necessário saber quando se deve terminar o processo de branqueamento, de modo a evitar a perda de estrutura dentária [4].

4.3.2 Peróxido de Carbamida

O peróxido de carbamida (CH_4N_2O) decompõem-se em ureia e PH, de acordo com:

$$CH_4N_2O \bullet H_2O_2 \rightarrow CH_4N_2O + H_2O_2 \tag{4.5}$$

O PH dissocia-se em posteriormente em água e oxigénio, e a ureia em dióxido de carbono e amónia. A libertação de ureia contribui para aumentar a estabilidade do agente ativo, levando a que a dissociação se dê lentamente. Além disso, a presença de carbopol ou glicerina nestes produtos desacelera a libertação de PH, sem prejuízo da eficiência [16]. A libertação lenta dos peróxidos tem, contudo, o inconveniente de aumentar a sensibilidade dentária [34].

4.4 Técnicas de branqueamento

Existem três principais abordagens terapêuticas indicadas ao branqueamento de dentes vitais: em ambulatório, em consultório e através de produtos de venda livre [6]. Neste trabalho, estudados os dois primeiros regimes de branqueamento.

O branqueamento em consultório (*in-office bleaching)*, é uma técnica que oferece branqueamento significativo logo após o primeiro tratamento. É utilizado PH em concentrações elevadas, aplicado sucessivas vezes por um curto período de tempo (geralmente, duas sessões de 20 minutos). É necessária proteção dos tecidos moles e a gengiva do paciente, através do isolamento absoluto com diques de borracha ou resina polimerizável. Podem ainda ser utilizados diferentes tipos de radiação para acelerar o procedimento, uma vez que a ativação por LEDs (do inglês Light-emitting diode) catalisa a decomposição do PH [4][5].

O branqueamento em ambulatório (*take-home bleaching),* implica o uso de uma moldeira termoplástica confecionada pelo médico-dentista. O paciente aplica o agente branqueador em casa durante algumas horas por dia ou durante a noite, segundo as indicações do profissional. O agente mais usado é o PC em concentrações de 10-24% (o equivalente a PH em concentrações de 3.5–6.5%), geralmente utilizado durante oito horas por dia, durante quatro semanas [2][6].

Os produtos de venda livre ou *over-the-counter*, estão disponíveis e farmácias e mercados e podem ser adquiridos por qualquer pessoa. Estes produtos contêm baixa concentração de agente ativo (3-6% PH) e são geralmente aplicados duas vezes por dia, durante duas semanas.

A presença de ácido cítrico ou fosfórico nestes produtos produz um ambiente ácido de atuação, que pode ser prejudicial para os dentes. Os produtos de venda livre incluem tiras/bandas de branqueamento, pastas dentífricas, colutórios e produtos *paint on* (pincéis com gel branqueador) [34].

4.5 Efeitos adversos

A utilização de PH e PC pode ter efeitos adversos ao nível dos tecidos moles e dos tecidos duros que, geralmente, são transitórios e reparáveis [2]. Os danos mais severos estão associados à utilização abusiva do agente branqueador em regimes de venda livre sem orientação médica, não existindo registos clínicos de danos no esmalte em tratamentos de branqueamento em consultório ou em ambulatório [34]. Contudo, vários estudos apontam para danos a nível da estrutura, composição e morfologia do esmalte não desprezáveis [6].

4.5.1 Sensibilidade dentária

O efeito secundário mais comum decorrente da utilização de branqueadores é sensibilidade dentária, que ocorre sobretudo durante a primeira hora de tratamento. Este efeito está relacionado com danos a nível da polpa e com a desidratação do dente, e tende a agravar com o aumento da concentração do agente ativo e duração do branqueamento [34].

O nitrato de potássio é muito usado como agente dessensibilizante, atuando através da inibição da despolarização da membrana celular e evitando, desta forma, a propagação do impulso nervoso associado à dor [34].

4.5.2. Danos nos tecidos moles

A irritação da mucosa gengival, geralmente relacionada com o desajuste da moldeira de branqueamento à boca do paciente, é o caso mais comum de danos nos tecidos moles [2]. Pode também ocorrer ulceração da gengiva por trauma após escovagem ou pelo contacto direto do agente branqueador em concentrações elevadas com o tecido, razão pela qual é fundamental realizar a proteção dos tecidos moles durante o tratamento [5].

4.5.3 Danos sobre o esmalte

A bibliografia diverge no que diz respeito ao efeito de produtos de branqueamento baseados em PH e PC de diferentes concentrações na morfologia e textura da superfície do esmalte, no que diz respeito ao aumento da porosidade, desmineralização e diminuição da concentração proteica, degradação da matriz orgânica, alteração da razão cálcio/fosfato e perda de cálcio. Alguns estudos apoiam a hipótese de que os agentes de branqueamento são componentes quimicamente ativos com potencial para provocar alterações estruturais no esmalte, enquanto que outros não apontam para mudanças significativas [6].

Apesar de alguns estudos indicarem que a perda mineral, especialmente de cálcio, causada pelos agentes branqueadores é desprezável e equiparável à causada por bebidas gaseificadas a atuar durante alguns minutos sobre o esmalte, outros estudos apontam para uma desmineralização relevante e a profundidades até 50 µm [41] [42].

A desmineralização é acompanhada, geralmente, por alteração da dureza superficial do esmalte, conduzindo à diminuição da resistência à abrasão e à fratura [43]. A perda de dureza encontra-se registada tanto para tratamento de venda livre e regime ambulatório, quanto ao tratamento de regime de consultório, podendo ser acompanhada de redução do módulo de elasticidade do dente e aumento da suscetibilidade a ataque cariogénico [44][45].

A alteração das propriedades mecânicas do esmalte é atribuída aos radicais livres altamente reativos e instáveis, que reagem com a maioria das moléculas orgânicas do esmalte para obter estabilidade [15]. Dado que os radicais livres são libertados como consequência da reatividade dos peróxidos, há uma relação direta ente o aumento da concentração de PC e PH e a desmineralização dentária [46]. A ureia resultante da degradação do PC é outro elemento a contribuir para a degradação do esmalte, desnaturando as proteínas constituintes da superfície interprismática e intraprismática do esmalte e aumentando a sua permeabilidade [47].

Por outro lado, verifica-se que os efeitos nefastos decorrentes da utilização branqueadores neutros são significativamente inferiores aos verificados em branqueadores ácidos, sugerindo que o a desmineralização está fortemente correlacionada com o baixo pH do produto, necessário para manter a estabilidade do agente ativo. Vários estudos sugerem que é o baixo pH, e não a exposição aos peróxidos, o responsável pelos danos verificados no esmalte [48] [7]. Em meio bucal, a desmineralização causada pela acidez dos branqueadores é parcialmente contrariado pela saliva, que atua como solução tampão e providencia a reposição de iões de Ca e P para remineralização [22].

Encontram-se igualmente documentadas alterações da micromorfologia superficial e rugosidade do esmalte decorrentes de diferentes regimes de branqueamento dentário, verificadas por microscopia eletrónica de varrimento, microscopia de força atómica, difração de raios X e ensaios de rugosidade superficial. Estas alterações conduzem ao aumento da porosidade do esmalte e, consequentemente, à retenção de placa bacteriana e ao aumento da sensibilidade dentária [47].

Não se registam diferenças qualitativas e quantitativas significativas entre os efeitos nefastos da aplicação de PH e PC para concentrações equivalentes. As diferenças registadas nas alterações na morfologia e dureza do dente são atribuídas, na maioria dos casos estudados, à concentração do agente ativo e ao regime de branqueamento aplicado [49].

5. Estado da arte

Sendo bem conhecido o papel do flúor na proteção contra a desmineralização, tem surgido o interesse de estudar, por diversas técnicas, o efeito do flúor na prevenção da desmineralização do esmalte sujeito a branqueamento pela inclusão do elemento no próprio produto branqueador ou em produtos remineralizadores. Neste capítulo serão abordados os trabalhos conduzidos neste sentido por aplicação das técnicas analíticas a utilizar no presente trabalho.

Os **testes de microdureza** são as técnicas mais utilizadas no estudo do potencial protetor do flúor no processo de branqueamento, em diferentes regimes [50].

Um trabalho de revisão conduzido por Attin et al. reuniu 55 estudos, envolvendo um total de 166 medições de dureza após o branqueamento e 69 realizados após branqueamento seguido de tratamento de remineralização, revelou que a percentagem de medições em que se verificou redução de microdureza por desmineralização do esmalte foi de 51% nos casos sem tratamento de remineralização e 29% nos casos com tratamento. A maioria dos casos em que se verificaram efeitos nefastos envolveu o uso de saliva artificial em vez de saliva humana para preservação dos dentes e a ausência de tratamentos de fluoretação [51].

Da Costa & Mazur [52] testaram o tratamento com 10% PC, 8h/dia durante 21 dias, com adição ou não de F, flúor fosfato acidulado (APF) e nitrato de potássio com flúor (PF) pelo teste de microdureza de Knoop. As medições foram realizadas antes, durante e após o tratamento. Todos os produtos branqueadores registaram diminuição de dureza durante o branqueamento. Contudo, duas semanas após o tratamento, verificou-se que todos os grupos que continham F registaram um aumento de dureza até ao valor medido inicialmente.

Geoge *et al*. [53], analisando os efeitos de produtos 10% PC com e sem F, observou resultados semelhantes, verificando, pelo teste de Vickers, redução da dureza pela aplicação do produto não fluoretado e aumento da mesma com a inclusão de F. Também Borges *et al*.[54], comparando produtos de 35% PH com e sem flúor e cálcio adicionado, concluiu que se verificava aumento da dureza do esmalte após branqueamento com produtos com F e Ca na sua composição.

Por outro lado, De oliveira *et al.* [55] verificou que a diminuição da microdureza de Vickers com tratamento 10% PC, 6h/dia durante 14 dias, com diferentes concentrações de Ca e F adicionado, não foi significativamente inferior ao produto branqueador sem os elementos remineralizadores. Contudo, manteve-se a hipótese que a inclusão de Ca e F pode ser benéfica na prevenção de uma perda mineral mais significativa.

Outros trabalhos de investigação sugerem que o potencial protetor do flúor está dependente do pH do branqueador. Attin *et al*. [56] submeterem dentes branqueados num regime em ambulatório com gel 10%PC com e sem flúor e com diferentes valores de pH a ciclos de desmineralização em ácido cítrico por 90 segundos, seguidos de um período mineralização em saliva artificial por 2 horas. Avaliando a microdureza, concluiu-se que o uso de géis neutros

enriquecidos com flúor diminui a desmineralização relativamente a todos os produtos sem o elemento e com pH inferior. Resultados semelhantes foram obtidos por Nascimento *et al*., [57] em que se verificou que, de entre os grupos sujeitos a branqueamento com 35%PH e diferentes concentrações de fluoreto de sódio (NaF) e pH distintos, o que registou menor perda de dureza correspondeu ao grupo com maior concentração de NaF e com pH neutro.

Lewinstein *et al*. [58] que, com base no teste de dureza de Knoop, compararam técnicas em consultório com 35%PC e 35%PH, com técnicas em ambulatório com produtos 15% PC com flúor adicionado e 10% PC sem flúor. Verificou-se que a presença de flúor no produto 15%PC apresentou menor redução de dureza relativamente ao produto de 10%PC sem flúor, mesmo possuindo uma maior concentração de agente ativo.

Relativamente ao método de **espectroscopia Raman,** existem registos de aplicação da técnica à análise do esmalte danificado, ao estudo dos efeitos dos branqueadores e à avaliação dos efeitos do flúor no processo de branqueamento.

Ko *et al.* [59] aplicaram pela primeira vez espectroscopia de Raman polarizada à análise de esmalte careado. O estudo permitiu concluir que a alteração da orientação da estrutura do esmalte em regiões de desmineralização pode ser quantificada pela observação do aumento da razão de despolarização (razão entre a intensidade da luz dispersa perpendicular e paralela à direção de polarização da luz incidente) e diminuição da anisotropia (direccionalidade da polarização) na gama de intensidades da banda do fosfato no espectro Raman de luz polarizada.

Santini *et al.* [60] estudaram as alterações da concentração de fosfato no esmalte dentário de um produto de branqueamento dentário 10% PC recorrendo a espetroscopia confocal μ-Raman. Verificou-se que a aplicação do produto durante 28 dias pelo período de 8h diárias resultou num decréscimo da intensidade do pico v_1 do ião PO_4^{3-} relativamente às medições iniciais, indicando desmineralização.

Berger *et al*.[61] recorreram a espectroscopia FT-Raman para avaliar as alterações nos picos de fosfato e carbonato de esmalte polido exposto a branqueadores de peróxido de hidrogénio de diferentes concentrações (10%, 35% e 50%), aplicados três vezes durante 30 minutos, efetuando a medição após cada aplicação. Os resultados revelaram desmineralização em todos os protocolos de branqueamento, independentemente da concentração de peróxido e do número de aplicações.

Castro *et al.*[62] avaliaram o potencial desmineralizador causado por dois produtos branqueadores, um de ph=3 e cerca de 38,6%PC e ph=4 e cerca de 30,4% PC, aplicados uma vez por dia durante 30 minutos ao longo de 39 dias e conservados em saliva humana entre aplicações. Foi calculado o grau de desmineralização através da intensidade do pico fosfato e verificado ao fim de 7 dias um grau de desmineralização de 65% no primeiro produto, mas ausência de desmineralização significativa no segundo produto até ao 21º dia. Ao fim dos 39 dias (utilização abusiva), a desmineralização foi significativa nos dois casos.

Cavalli *et al*. [63] aplicaram espectroscopia FT-Raman e teste de microdureza Knoop ao estudo dos efeitos da adição de flúor e cálcio a agentes branqueadores 10% PC na desmineralização superficial do dente. O procedimento consistiu em submeter 60 dentes polidos a diferentes agentes branqueadores durante 14 dias, 6 horas por dia. Os resultados revelaram que a perda mineral significativa sofrida pelas amostras sob o efeito de tratamentos com PC podia ser controlada pela adição de F e Ca aos agentes branqueadores.

A **técnica de EDXRF** foi também já previamente utilizada na avaliação da desmineralização dentária causada por branqueadores e ao potencial protetor do flúor a esmalte sujeito a baixo pH. A técnica é geralmente aplicada à avaliação da alteração da concentração individual dos elementos do esmalte.

Godinho *et al*. [64] avaliaram a alteração do conteúdo elementar de P, Ca e Zn no esmalte após tratamento com gel branqueador 10% PC durante 8h diárias em 14 aplicações, tendo concluído que não se dá desmineralização significativa utilizando o produto segundo as instruções do fabricante. Silveira *et al*. [65] estudaram a alteração da concentração elementar de Ca, P, Fe, Cu, Zn, Pb e Sr após utilização de dois tipos de branqueadores (40% PH e 10% PC), concluindo o mesmo.

Por outro lado, Sorozini *et al.* [66] usaram EDXRF na análise de dentes branqueados com 10% PC durante 6 horas por dia, 9,5% PH em duas sessões de 30 minutos e com tiras branqueadoras duas vezes durante 30 minutos, tendo identificado diferenças nas concentrações de Ca e P nos dentes tratados com tiras branqueadoras e alterações na razão Ca/P no grupo tratado com PC.

Carvalho Filho *et al.* [67] estudaram por EDXRF os efeitos da aplicação de diferentes marcas de géis e vernizes do flúor na proteção da dissolução de dentes de bovino por sumo de laranja e refrigerantes. Os resultados da avaliação da razão Ca/P permitiram concluir que tanto os vernizes como os géis de flúor contribuem fortemente para a proteção da erosão dentária externa causada por agentes ácidos.

A avaliação da razão entre os fenómenos de dispersão Compton/Rayleigh nos espetros como medida da desmineralização do esmalte, a aplicar neste trabalho, é uma abordagem inovadora, apesar de já ter sido aplicado para fins biomédicos na avaliação da concentração mineral na trabécula dos ossos[68] e da composição em gordura do fígado[69]. Registam-se igualmente vários estudos dedicados à relação entre a razão Rayleigh/Compton e o Z_{ef} de uma amostra, existindo na literatura curvas de calibração para diferentes intervalos de Z,[70] abrangendo diferentes modelos matemáticos para o cálculo de Z_{ef}.[71] Contudo, até à data, nunca foi estabelecida esta relação para os valores de Z_{ef} associados ao esmalte são e danificado.

A **técnica PIGE** nunca foi aplicada em estudos envolvendo branqueadores dentários. Existem, contudo, algumas aplicações do método à análise de dentes careados tratados com materiais reparadores contendo flúor e à determinação da concentração de F em dentes sãos.

Komatsu *et al*. [72] recorreram a PIGE para medir a absorção de F pelo esmalte sujeitos a *Fluoride Containing Materials* (FCM), em dois ciclos de mineralização e desmineralização que simulavam condições de alto e baixo risco para desenvolvimento de cáries. Foi utilizado um micro feixe de protões com 1,7MeV de energia, 1μm de diâmetro e uma corrente de 100pA, sendo os raios gama provenientes da reação nuclear $^{19}F(p,\alpha\gamma)^{16}O$ coletadas por um detetor de NaI. O estudo permitiu concluir que a técnica é eficaz na quantificação da incorporação de F pelo esmalte, e que o potencial protetor dos FCM depende do risco a cáries a que o dente é exposto.

Funato *et al*. [73] utilizaram emissão de raios X/gama induzida por micro-feixe (PIXE/PIGE) para analisar quantitativamente a distribuição de F e Sr em amostras de molares com cáries. As cáries foram preenchidas com materiais reparadores contendo F e Sr e sujeitas a alterações cíclicas de pH durante 5 semanas. Foi usado um microfeixe de 3 MeV com 1μm de diâmetro e uma corrente de 100 pA e a concentração de flúor deteta através da medida a radiação emitida na reação nuclear $^{19}F(p,\alpha\gamma)^{16}$. Verificou-se que o flúor se distribui maioritariamente à superfície do esmalte.

Yamamoto *et al*. [74] recorreram a PIGE para medir a distribuição de F na micro área de amostras de dentes com cáries preenchidas com materiais reparadores. Os raios gama provenientes da reação nuclear $^{19}F(p,\alpha\gamma)^{16}O$ foram coletadas por um detetor de NaI e os resultados apresentados na forma de um mapa bidimensional, sendo possível visualizar a distribuição do flúor ao longo do dente. Concluiu-se que a concentração de F diminui gradualmente em profundidade e que a sua distribuição depende do tipo de material reparador.

Arshed *et al.* [75] utilizaram a técnica PIGE para calcular a distribuição de F em camadas de esmalte com dois milímetros de espessura, provenientes de 8 dentes, fazendo a medição em 8 pontos distintos. Foi usado um microfeixe de 872 keV com 250μm de diâmetro, corrente de 10 nA e carga entre 5 e 7μC. A radiação emitida na reação nuclear $^{19}F(p,\alpha\gamma)^{16}O$ permitiu estimar a concentração de F, que oscilou entre 81 e 800 ppm para diferentes amostras.

Os estudos acima abordados apontam para a adequação das técnicas analíticas a utilizar ao estudo em causa. A maioria dos resultados revelam uma correlação positiva entre a presença do elemento e a prevenção da perda das suas propriedades causada por branqueadores e outros agentes ácidos. Pode-se, assim, supor que a inclusão de F nos tratamentos de branqueamento dentário terá um papel protetor na perda de conteúdo mineral do esmalte, passível de ser verificada pelos métodos planeados. Por outro lado, as abordagens inovadoras que serão empregues e a conjugação dos resultados obtidos pelas quatro técnicas têm potencial para oferecer uma nova perspetiva sobre a questão.

6. Técnicas analíticas

No contexto dos estudos em causa, foi fundamental recorrer a técnicas analíticas não destrutivas que permitissem a análise da mesma amostra antes e depois do branqueamento (medidas *self-control*).

6.1 Espetroscopia Raman

A dispersão de Raman foi descoberta por Krishna e Raman em 1928 e inspirou grande debate científico relativamente à teoria, instrumentação e aplicações da espectroscopia Raman. As limitações da técnica, relacionados com a fraca intensidade e a interferência da fluorescência têm sido ultrapassadas com o avanço da tecnologia e da ciência, aumentando a preponderância desta técnica no contexto da análise química [76].

A técnica baseia-se na identificação dos modos vibracionais de uma amostra para a determinação da sua composição e estrutura, apresentando um espectro da intensidade em função do desvio do número de onda das radiações incidente e dispersa [77].

6.1.1. Vibrações Moleculares

O movimento vibracional de uma molécula corresponde à mudança periódica nas distâncias de ligação e/ou ângulos da estrutura molecular. A vibração é descrita através da frequência fundamental associada aos diferentes tipos de movimento vibracional [78].

Os modos de vibração normal de uma molécula podem ser divididos nos modos: alongamento (*stretching)*, do tipo simétrico ou antissimétrico; e deformação, que inclui flexão (*bending)*, balanço (*rocking),* tesoura *(scissoring)*, ondulação (*wagging)* e torção (*twisting)*. No primeiro modo é contabilizada a variação da distância entre átomos, e no segundo a variação do ângulo entre as ligações [79]. Nem todas as vibrações serão observadas por espectroscopia Raman, sendo apenas ativas as que causam uma mudança de polarizabilidade significativa. Para tal, a simetria da molécula é determinante [80].

No caso em estudo, a molécula de interesse é o ião PO_4^{3-}, que apresenta para a região de energia em estudo, modos vibracionais de alongamento simétrico (v_1) e antissimétrico (v_3) e de deformação angular simétrica (v_2) e assimétrica (v_4). Será dado enfoque ao modo v_1 [81].

6.1.2. Princípios Físicos da Espectroscopia Raman

A interação de fotões com a matéria pode resultar na sua absorção ou dispersão. A dispersão do fotão pode ser elástica, se a radiação dispersa mantiver o comprimento de onda inicial, ou inelástica, se ocorrer transferência de energia do fotão para o meio. A dispersão Raman é um processo de dispersão inelástica, podendo resultar num fotão disperso com maior ou menor energia.

Classicamente, uma molécula pode ser vista como um núcleo carregado positivamente rodeado por uma nuvem de eletrões negativamente carregados. Quando a luz interage com a molécula, o campo elétrico E da radiação induz um momento dipolar þ na molécula, dependente do seu estado de polarizabilidade α:

$$þ = \alpha E = \alpha E_0 \, cos(2\pi \upsilon_0 t) \tag{6.1}$$

A polarizabilidade define a capacidade de uma molécula distorcer a sua forma original por influência de um campo externo. Se a molécula vibrar, a polarizabilidade sofrerá alterações. Assumindo que a vibração é uma harmónica simples, o desvio *q* da posição de equilíbrio pode ser expressa em função da amplitude q_0 e da frequência de vibração e υ_{vib} como:

$$q = q_0 \, cos(2\pi \upsilon_{vib} t) \tag{6.2}$$

Expandindo a polarizabilidade em série de Taylor e fazendo uso de propriedades trigonométricos, podemos exprimir **þ** como

$$þ = \alpha E_0 \, cos(2\pi \upsilon_0 t) + \frac{1}{2}\frac{\partial \alpha}{\partial q} \, q_0 E_0 [cos(2\pi(\upsilon_0 + \upsilon_{vib})t) + cos(2\pi(\upsilon_0 - \upsilon_{vib})t)] \tag{6.3}$$

Os primeiros termos oscilam com frequência υ_0 e produzem dispersão elástica de Rayleigh, os segundos oscilam a $\upsilon_0 + \upsilon_{vib}$, produzindo dispersão Raman anti-Stokes, e os terceiras oscilam com $\upsilon_0 - \upsilon_{vib}$, produzindo dispersão Raman Stokes [78].

Do ponto de vista quântico, a dispersão de Raman pode ser abordada avaliando as transições energéticas envolvidas. Se a energia do fotão não for suficiente para excitar a molécula para um estado eletrónico superior, esta absorve o fotão e é excitada para um nível virtual de energia. A partir deste estado virtual, o sistema molecular relaxa instantaneamente para um estado de menor energia.

Se o eletrão transitar para o estado fundamental, o fotão inicial e o disperso terão a mesma energia e ocorre dispersão de Rayleigh. Se a transição envolver um estado vibracional excitado, ocorre dispersão Raman. Moléculas inicialmente no estado vibracional fundamental originam dispersão Raman Stokes, enquanto que moléculas inicialmente num estado vibracional excitado originam dispersão anti-Stokes (figura 6.1) [80]. À temperatura ambiente, a maioria das moléculas encontra-se no estado fundamental, pelo que a intensidade das linhas Raman Stokes é muito mais intensa [78].

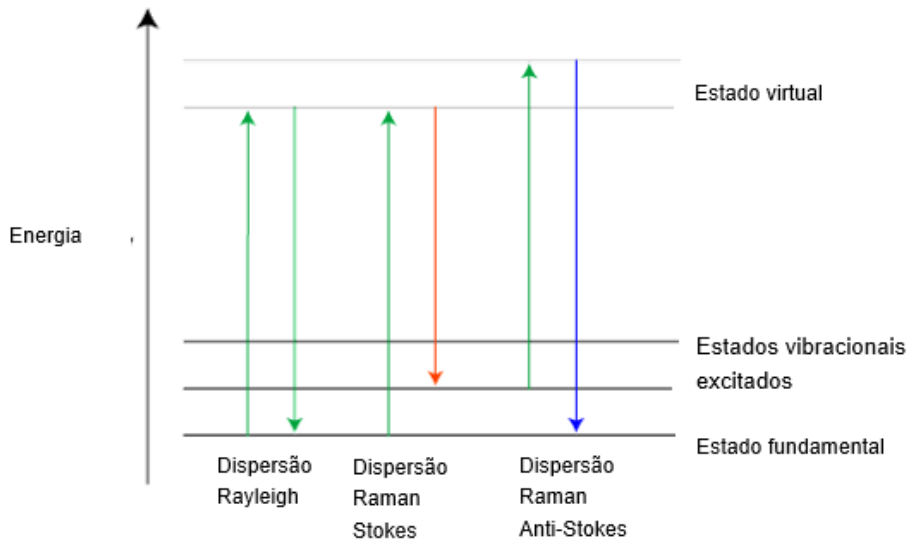

Figura 6.1-Representação das transições associadas aos fenómenos de dispersão de Rayleigh, dispersão Raman Stokes e dispersão Raman Anti-Stokes. Adaptado de [82].

Os elementos da amostra em estudo são identificados a partir da diferença da frequência da luz emitida em relação à frequência da luz de excitação, bem como pela forma e intensidade da banda [77].

6.1.2.Fluorescência

Os principais artefactos nos espectros de espectroscopia Raman estão relacionados com a ocorrência do fenómeno de fluorescência, que pode ser até 10^7 vezes mais intenso que o sinal Raman. As técnicas que visam diminuir a fluorescência tomam partido das diferenças entre a dispersão de Raman e este fenómeno, nomeadamente:

- A fluorescência, ao contrário do efeito Raman, só ocorre se a molécula transitar paraum estado eletrónico excitado;
- Os picos de fluorescência são mais largos;
- A fluorescência é não polarizada;
- A emissão de fluorescência ocorre sempre com comprimento de onda superior ao da fonte de excitação [78].

Um dos métodos experimentais mais usados para reduzir este efeito é a excitação com infravermelho-próximo. Usando radiação de excitação na zona do infravermelho (maior comprimento de onda), a energia do fotão não será alta o suficiente para excitar as moléculas para o seu primeiro estado excitado e causar fluorescência. Este método tem, no entanto, o inconveniente de reduzir também a intensidade da dispersão de Raman pois ela é inversamente proporcional ao comprimento de onda do laser incidente [78][80].

6.1.4.Espectroscopia µ-Raman confocal

Para efetuar a excitação dos compostos, um espectrómetro Raman possui um laser díodo que faz incidir radiação de comprimento de onda específico sobre a amostra. A análise microsc é conseguida através do acoplamento de um microscópio ótico com várias ampliações (10x, 50x ou 100x) ao espectrómetro, que foca o laser através da objetiva num ponto preciso. A fim de reduzir o efeito da dispersão de Rayleigh após a incidência no espécimen analisado, a radiação é direcionada para filtros passa-banda. De seguida, o feixe é focado numa abertura *pinhole* e orientada para um monocromador. Este pinhole garante, por confocalidade, que apenas o sinal proveniente de um reduzido volume de amostra chega ao detetor. Por fim, a radiação atravessa uma rede de difração e é coletada por um detetor CCD (*charge coupled devices*) [33].

A figura 6.2 representa os principais componentes do espectrómetro Raman.

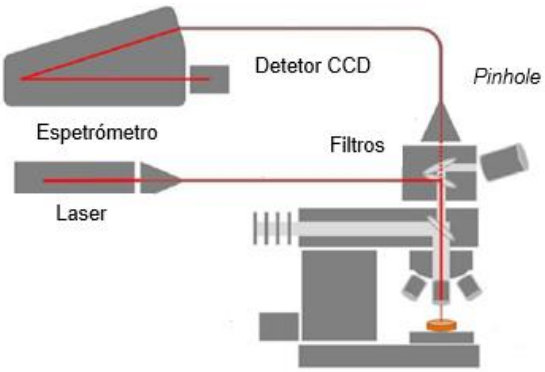

Figura 6.2-Representação dos principais componentes do dispositivo de Raman confocal. Adaptado de [82].

6.1.5.Vantagens e limitações da técnica

A tabela 6.1 sintetiza as principais vantagens e limitações da técnica de espectroscopia Raman [40] [44].

Tabela 6.1-Vantagens e limitações da técnica de espectroscopia Raman.

Vantagens	Limitações
Técnica não invasiva, rápida e não destrutiva	Interferência da fluorescência e baixa intensidade do sinal
Boa resolução espacial (até 1 µm de diâmetro)	Elevado custo do equipamento
Não requer preparação prévia da amostra	Exige concentração do composto superior a 1-5%

6.2 Espetroscopia por fluorescência de raios X

Os raios X são ondas eletromagnéticas de comprimento de onda entre 0,005 e 10 nm. Foram descobertos por Wilhelm Conrad Röntgen em 1985, na sequência de experiências realizadas em tubos de descarga. Röntgen verificou que esta radiação ionizante provocava um efeito de fluorescência, visível mesmo quando o tubo se encontrava coberto por um papel preto [77].

A espetrometria de fluorescência de raios X dispersiva em energia apresenta os resultados da medição dos raios X caraterísticos num espectro de intensidade em função da energia. A posição dos picos indica quais os elementos presentes e a altura relativa dos picos associados a diferentes valores de energia indica as percentagens de cada elemento de numa amostra [83].

6.2.1 Interação dos Raios X com a matéria

O **efeito fotoelétrico** é o fenómeno mais importante na atenuação dos raios X, na gama de energia utilizada neste estudo (<50 keV). O efeito ocorre quando um eletrão de uma camada interna é expelido por um fotão incidente com energia igual ou superior à energia da camada em que se encontra o eletrão. O fotão primário é aniquilado, enquanto um fotão secundário é emitido após o rearranjo eletrónico com ocorrência de fluorescência de raios X. Os eletrões na camada K, que são os mais fortemente ligados, são os mais importantes para os valores de energia em causa [80].

A **dispersão de Rayleigh** é o processo através do qual os fotões são dispersos por eletrões fortemente ligados e em que o átomo não é ionizado nem excitado. Trata-se de um fenómeno de dispersão coerente, através do qual os fotões são dispersos sem variação de energia e mantendo a mesma relação de fase com os fotões incidentes. Ocorre maioritariamente a baixa energia e para materiais com alto valor de Z [80].

A **dispersão de Compton** é uma forma de dispersão incoerente da radiação, que resulta da interação de um fotão com um eletrão fracamente ligado ao átomo. Parte da energia do fotão incidente é absorvida e convertida em energia cinética do eletrão, levando a que o fotão disperso sofra perda de energia e mudança de direção relativamente ao fotão incidente. A perda de energia corresponde a um aumento do comprimento de onda da radiação dispersa, que pode ser medida em função do seu ângulo de deflexão. O fenómeno ocorre com maior probabilidade em amostras de baixo número atómico [80] [84].

A probabilidade de cada um destes eventos é expresso através do conceito de secção eficaz. A secção eficaz colisional total, quando multiplicada pelo número de átomos por centímetro cúbico no material, corresponde ao coeficiente de atenuação linear, μ, por centímetro percorrido. Considerando um feixe paralelo e monocromático, a atenuação da intensidade I_0 ao atravessar um material de espessura *x* é descrita pela lei de Lambert-Beer:

$$I = I_0 e^{-\mu x} \tag{6.4}$$

Se o material absorvedor for um composto químico ou uma mistura, o coeficiente de atenuação linear pode ser avaliado a partir dos coeficientes μ_i de cada elemento, ponderados pelo seu peso na amostra. Este valor permite relacionar a variação da intensidade da fluorescência com a concentração de um elemento no composto a analisar [77].

A figura 6.3 ilustra os principais fenómenos de interação dos raios X com a matéria.

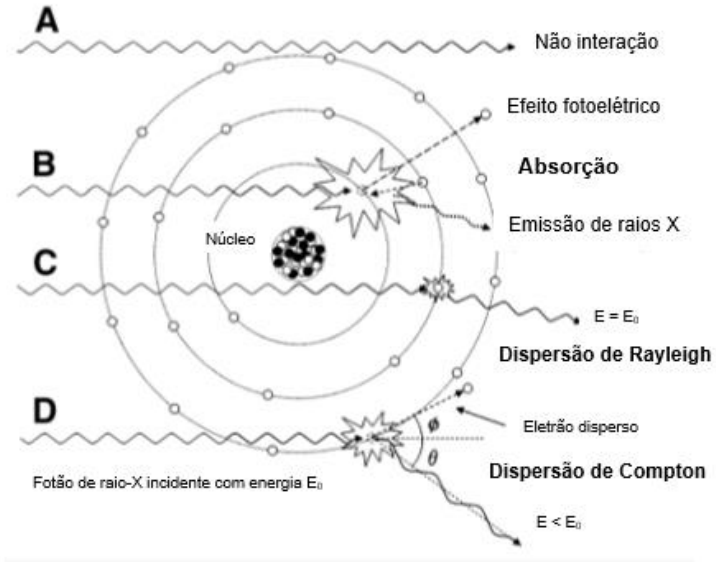

Figura 6.3-Ilustração dos fenómenos de interação dos raios X com a matéria: (A) radiação primária não atenuada; (B)absorção fotoelétrica; (C) dispersão de Rayleigh; (D) dispersão de Compton. Adaptado de [85].

.

6.2.2 Produção de Raios X

A produção de raios X característicos envolve a transição dos eletrões entre camadas permitidas, associadas à ionização de camadas atómicas interiores. Quando um eletrão é ejetado de uma camada pelo bombardeamento de um eletrão ou pela absorção de um fotão, o átomo fica ionizado e o ião é deixado num estado de energia superior. A transição de um eletrão de uma camada superior para esta lacuna origina emissão de raios X, de energia correspondente à diferença energética entre as camadas envolvidas [77].

Quando a energia associada às transições energéticas não é emitida sob a forma de radiação X, mas sim transmitida a outro eletrão, este é ejetado do átomo, gerando eletrões Auger. Este efeito é competitivo com o fenómeno de fluorescência e a sua probabilidade é tanto maior quanto menor a diferença de energia entre os níveis de transição e menor o Z do elemento [77].

Existe um segundo processo de produção de raios X, resultante da desaceleração rápida de eletrões primários ao incidir sobre um material de Z elevado. Este fenómeno resulta na emissão contínua de radiação, designada por radiação *Bremsstrahlung*. A emissão traduz-se

como uma risca contínua nos espectros de espectroscopia de raios X, sobre a qual se encontram evidentes os raios X característicos [79].

6.2.3. Princípios da Fluorescência de Raios X

A fluorescência de raios X baseia-se na emissão de raios X característicos, que resultam das transições entre camadas internas de um átomo. Através do bombardeamento com raios X de excitação, é emitido um eletrão e deixada uma lacuna na sua orbital, geralmente a mais energética (K). Se a lacuna deixada pelo eletrão emitido da camada K for preenchida por um eletrão da camada L, a transição é acompanhada da emissão de uma linha de raio X conhecida como K_{α}; se eletrão for preenchida por um eletrão da camada M, a transição é acompanhada da emissão de uma linha de raio X conhecida como K_{β}. A energia emitida na transição pode ser medida num detetor de raios X e é característica de cada elemento, permitindo estudar a composição de uma amostra (figura 6.4) [77].

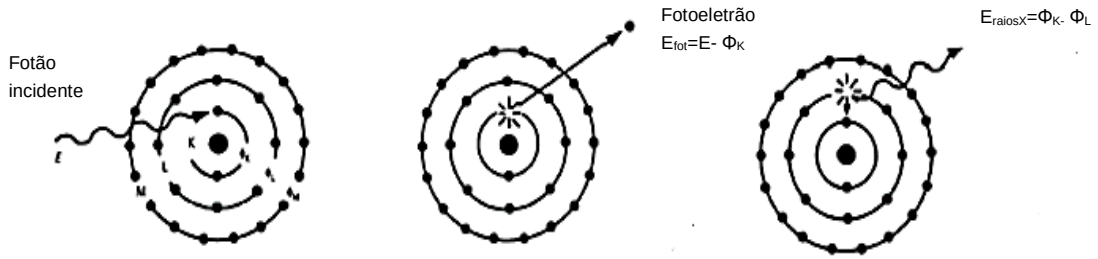

Figura 6.4-Representação dos fenómenos de relaxação radiativa por emissão de fluorescência de raios-X. ΦK e ΦL representam as energias de ligação das camadas K e L, respetivamente. Adaptado de [77].

O número de fotões de dada energia é traduzido pela intensidade dos picos dos raios X no espectro, e expressa a concentração relativa do elemento na amostra. Desta forma, a técnica permite não só uma análise qualitativa, mas também quantitativa de um espécime [77].

6.2.4.2.Fluorescência de raios-X com geometria triaxial

Uma conceção de um dispositivo de EDXRF é o espectrómetro com geometria ortogonal triaxial entre o tubo de raios X, um alvo secundário, a amostra e o detetor (figura 6.5). Esta geometria tem a vantagem de reduzir o fundo causada pela emissão *Bremsstrahlung* produzida no tubo, através da polarização da radiação no alvo secundário e na amostra [86].

Quando a radiação na gama de energia usada em EDXRF interage com o alvo secundário, a dispersão do feixe a um ângulo de 90º polariza os raios X incidentes, conduzindo à erradicação de grande parte da radiação de *Bremsstrahlung* detetada. Depois, a dispersão da radiação proveniente do alvo secundário na amostra, que também ocorre a 90º, eliminará a radiação *Bremsstrahlung* remanescente. Desta forma, não existe praticamente qualquer radiação

proveniente do tubo a interagir com o detetor, o que permite aumentar significativamente a razão sinal-ruído [86].

O feixe que irá interagir com as amostras resultará maioritariamente da emissão de raios X característicos K_α e K_β do alvo secundário, resultantes da excitação pela radiação emitida pelo tubo de raios X. Para garantir a ortogonalidade entre a radiação que interage com a amostra e os raios X característicos que chegam ao detetor, são incluídos colimadores [86].

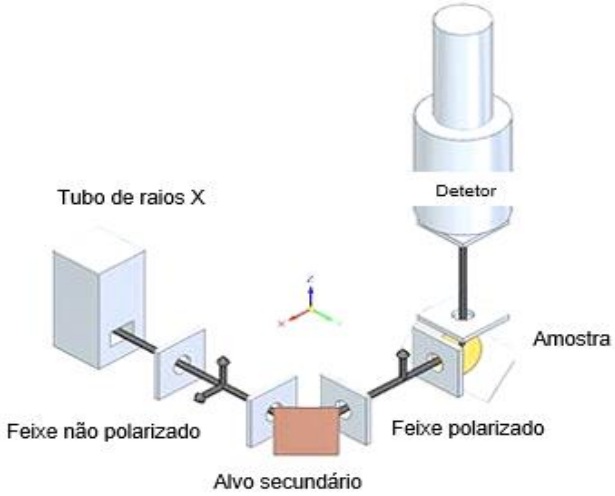

Figura 6.5-Esquema representativo da geometria axial. Adaptado de [87].

6.2.6.Vantagens e limitações

A tabela 6.2 sintetiza as principais vantagens e limitações da técnica EDXRF [53].

Tabela 6.2-Vantagens e limitações da técnica EDXRF.

Vantagens	Limitações
Técnica não destrutiva, de elevada precisão	Sensibilidade baixa para elementos de baixo Z (deteção limitada aos elementos entre o Berílio e o Urânio)
Técnica simples e económica	Penetrabilidades dos raios X não ultrapassa a gama de 0,01-0,1 mm
Deteção de vários elementos simultaneamente	Limites de deteção modestos
Baixo tempo de irradiação requerido	

6.3 Emissão de raios gama induzida por partículas – PIGE

A radiação gama é a radiação de maior gama de energia, resultante do decaimento de núcleos atómicos. Este tipo de radiação foi descoberta pelo químico e físico francês Paul Villard em 1900 enquanto estudava a radiação emitida pelo elemento rádio e classificada como raios-gama por Rutherford em 1903 [84].

A técnica de emissão de raios gama induzida por partículas é baseada na ocorrência de reações nucleares de ressonância, resultantes da incidência de um feixe de partículas carregadas, geralmente protões, sobre uma amostra. A intensidade dos raios gama emitidos na sequência da reação é medida em função da energia das partículas bombardeadas, resultando num espectro de excitação que permite estimar a concentração média dos elementos constituintes da amostra [88].

6.3.1 Interação da radiação gama com a matéria

A interação da radiação com a matéria pode conduzir à ocorrência dos fenómenos efeito fotoelétrico, dispersão de Compton ou produção de pares. A probabilidade destas interações está dependente da energia da radiação incidente e do Z do material absorvedor. Para a gama de energia em causa (1 – 3 MeV), o efeito de Compton e a produção de pares são os fenómenos mais prováveis. Estes fenómenos surgem nos espectros de PIGE como representado na figura 6.6.

O efeito de Compton é representado nos espectros de emissão gama como uma distribuição contínua, que corresponde à distribuição de energia dos eletrões dispersos sob diferentes ângulos no detetor. O contínuo de Compton estende-se até um valor de energia máxima, correspondente ao bordo de Compton. Sobreposto à distribuição contínua, pode ainda surgir um pico de *backscattering*, que corresponde aos eletrões dispersos a 180º.

A produção de pares é um fenómeno que resulta na produção de um eletrão e de um positrão, que ocorre quando a energia do raio gama é igual ou superior à soma das energias das duas partículas geradas (1022 keV). Quando o eletrão e o positrão sofrem aniquilação em contacto mútuo, ocorre conversão da energia associada à massa das duas partículas em dois fotões gama de energia de 511 keV. Se um ou dois fotões escaparem do detetor, podem surgir picos de espace de energia Eγ – 1022 keV ou Eγ - 511 keV [89].

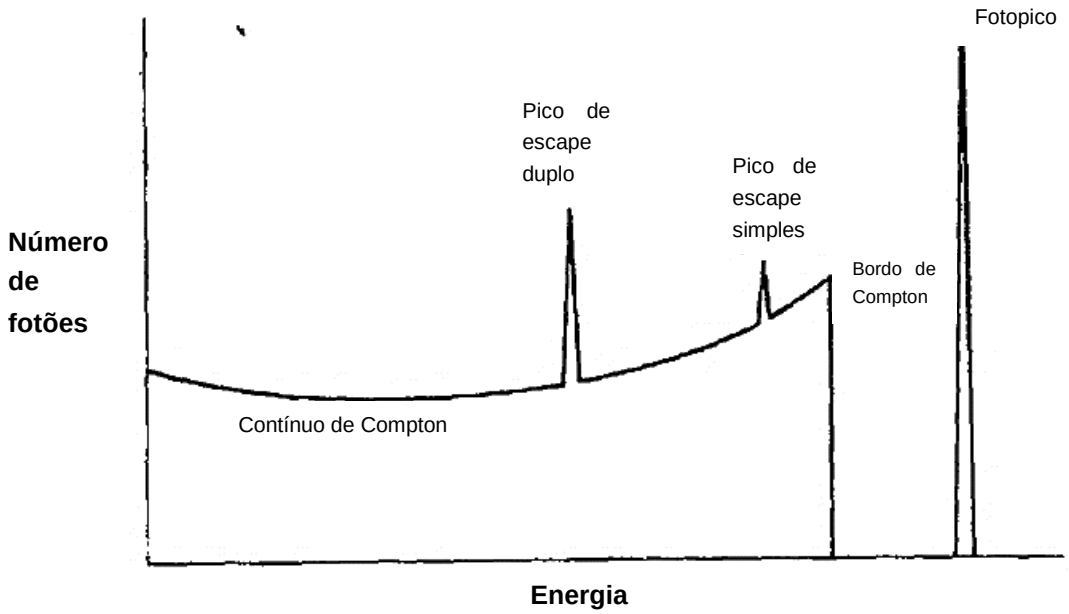

Figura 6.6-Representação dos fenómenos de interação da radiação gama com a matéria: efeito Compton (contínuo e bordo de Compton), efeito fotoelétrico (fotopico) e produção de pares (pico de escape simples e duplo). Adaptado de [89].

6.3.1. Reações de ressonância com emissão gama

A interação de um feixe de partículas com o alvo pode ocorrer com os eletrões ou com o núcleo da amostra. As colisões mais prováveis ocorrem entre a partícula incidente e os eletrões do alvo, sendo a interação feita através de forças Coulombianas. Quando a colisão se dá com o núcleo do alvo, pode ocorrer dispersão (de Coulomb ou Rutherford) ou interação com o potencial nuclear, a qual pode conduzir a uma reação nuclear. Com o aumento da energia das partículas, pode ainda ocorrer interação com os nucleões do alvo [89].

As reações de ressonância nuclear ocorrem quando, pela interação com partículas carregadas de energia específica, se causa a excitação nuclear de um elemento, induzindo transições para estados de energia mais elevados. A subsequente desexcitação do núcleo conduz à emissão de radiação.

Existem três tipos de reações de ressonância que podem conduzir à emissão de raios gama: captura radiativa, dispersão inelástica e colisões com rearranjo.

Na **captura radiativa**, o projétil (*a*) é capturado pelo núcleo alvo *A* e é formado um núcleo *B*,* num estado excitado. *O* núcleo em estado excitado decai para o estado *B* por emissão gama. Os exemplos típicos desta reação são as reações de captura protónica.

A **dispersão inelástica** ocorre quando não há alteração das partículas, mas o alvo fica num estado excitado e o projétil é disperso com diferente energia. A emissão de radiação dá-se, mais uma vez, por desexcitação do núcleo excitado.

Nas **colisões com rearranjo**, são emitidas partículas diferentes da partícula incidente e do núcleo alvo.

De entre as reações de ressonância nuclear causadas por iões leves, as induzidas por protões são as mais usadas em PIGE, uma vez que a maioria dos elementos leves regista ressonância por reações (p, γ) ou (p, α γ) com energias de bombardeamento abaixo de 2 MeV.

A tabela 6.3 sumariza as reações genéricas de emissão de radiação e a reação induzida por protões correspondente a cada fenómeno de ressonância [88].

Tabela 6.3-Reações nucleares que ocorrem com emissão radiação gama.

Captura radiativa	$a + A \rightarrow B^* \rightarrow B + \boldsymbol{\gamma}$	(p, $\boldsymbol{\gamma}$)
Dispersão inelástica	$a + A \rightarrow A^* + a' \rightarrow A + a' + \gamma$	(p, p´ γ)
Colisão com rearranjo	$a + A \rightarrow B^* + b \rightarrow B + b + \gamma$	(p, α γ)

Neste trabalho, será estudada a reação de dispersão inelástica induzida por protões sobre o flúor: $^{19}F(p, p' \gamma)^{19}F$, que conduz à emissão de radiação gama de energia de 110 e 197 keV [90].

6.3.2. Secção eficaz

A probabilidade de ocorrência de uma reação nuclear é expressa pelo conceito de secção eficaz, σ, definida por:

$$\sigma = \frac{R}{I\,N} \tag{6.4}$$

Sendo *I* a corrente de partículas incidentes, *N* o número de núcleos alvo por unidade de área e *R* a taxa de produção de partículas gama.

Contudo, as partículas gama resultantes das reações nucleares de ressonância são emitidas segundo uma dada distribuição angular dependente dos ângulos de dispersão θ e φ, $W(\theta, \varphi)$, e o ângulo sólido do detetor, $d\Omega$, é pequeno. Assim, apenas uma pequena fração das partículas gama emitidas são detetadas (figura 6.7). Esta fração é descrita por:

$$dR = W(\theta, \varphi)\frac{d\Omega}{4\pi} \tag{6.5}$$

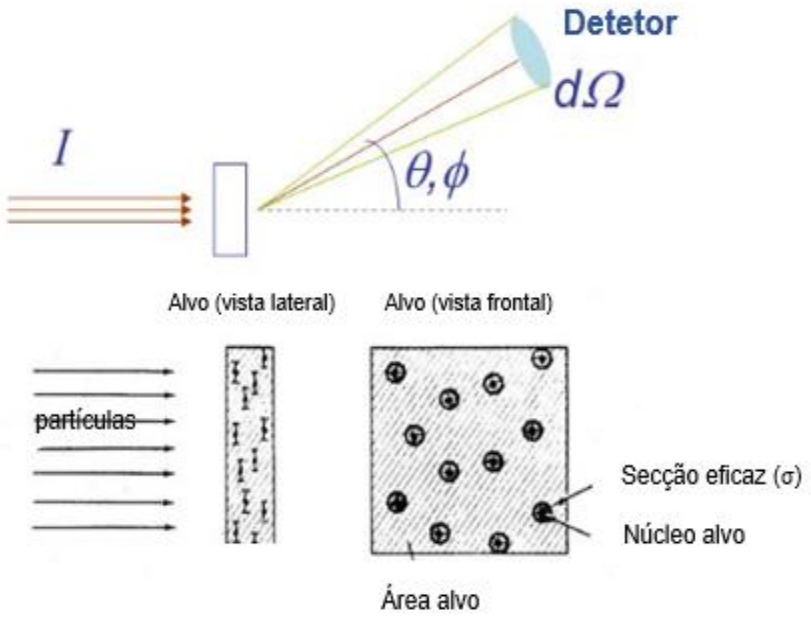

Figura 6.7- Representação da dispersão e deteção de partículas após interação (cima) e do alvo e respetiva secção eficaz (baixo).Adaptado de [91].

Desta limitação resulta que apenas uma deduzida uma pequena fração da secção eficaz, $\frac{d\sigma}{d\Omega}$, denominada secção eficaz diferencial:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{W(\theta,\varphi)}{4\pi\, I\, N} \tag{6.6}$$

A secção eficaz total resulta da integração da secção eficaz diferencial para todos os ângulos, sabendo que $d\Omega$= *sen*$(\theta)\ d\theta\ d\varphi$:

$$\sigma = \int \frac{d\sigma}{d\Omega} d\Omega = \int_0^{\pi} \mathrm{sen}(\theta) d\theta \int_0^{2\pi} d\phi \frac{d\sigma}{d\Omega} \tag{6.7}$$

E como $\frac{d\sigma}{d\Omega}$ é independente de ϕ, vem:

$$\sigma = 4\pi \frac{d\sigma}{d\Omega} \tag{6.8}$$

A relação entre a secção eficaz de um elemento e a energia das partículas incidentes é expressa através de funções de excitação. O conhecimento preciso do valor da secção eficaz para um dado intervalo de energia é fundamental para a implementação do código que permite calcular a concentração de F numa amostra espessa [92].

6.3.2 Poder de paragem

O poder de paragem traduz a perda de energia (*dE*) por unidade de comprimento (*dx*) de uma partícula incidente em interação com o alvo:

$$S = -\frac{dE}{dx} \tag{6.9}$$

Esta perda de energia ocorre maioritariamente por dois fenómenos: interação Coulombiana entre a partículas e os eletrões ligados ou livre (poder de paragem eletrónico) ou interação com núcleos blindados ou não blindados do alvo (poder de paragem nuclear). O ponto onde a partícula perde toda a sua energia devido a estas interações define o alcance.

Como o poder de paragem depende da espessura do alvo (*d*), é comum recorrer à secção eficaz de paragem, definida por:

$$\varepsilon(E) = \frac{S}{d} \tag{6.10}$$

O poder de paragem é um parâmetro essencial para o cálculo da concentração de F e será estimado através de equações empíricas e pela lei de Bragg, que estabelece que a secção de paragem de um composto é dada pela média pesada das secções eficazes dos seus elementos constituintes [92].

6.3.2 Princípios Físicos de PIGE

A técnica PIGE baseia-se na utilização das reações de ressonância nuclear já descritas para analisar quantitativamente e qualitativamente uma amostra. Os níveis de energia nuclear são específicos para cada isótopo, pelo que a deteção da energia específica dos raios gama emitidos permite identificar o elemento [90].

A energia do feixe de bombardeamento, E_b, deverá ser superior à energia de ressonância do núcleo, E_r, para estudos em profundidade, ou igual, para estudos à superfície. A radiação emitida resultante da incidência de partículas com esta energia de bombardeamento reflete a concentração de um elemento na região à profundidade na qual as partículas incidentes são paradas, uma vez que a radiação é emitida no ponto em que a energia de bombardeamento iguala a energia de ressonância do núcleo (figura 6.8). Medindo a intensidade da radiação gama emitida em função da energia de bombardeamento, obtém-se informação suficiente para deduzir o seu perfil da concentração na amostra [88].

Contudo, a técnica restringe-se à análise de elementos leves, tipicamente entre o Lítio (Z=3) e cálcio (Z=20), pois à medida que o número atómico aumenta, aumenta a intensidade da força repulsiva de Coulomb do núcleo, tornando difícil a interação do feixe de protões com o núcleo e a subsequente excitação de protões ou neutrões no seu interior [90].

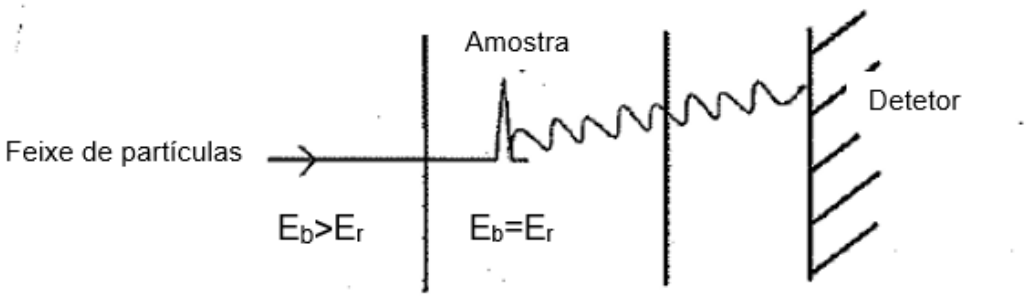

Figura 6.8-Representação do método de ressonância de PIGE. A amostra bombardeada com partículas de energia superior à energia de ressonância emitirá raios γ à profundidade na qual a energia da partícula bombardeada coincide com a energia de ressonância. Adaptado de [88].

6.3.2 Mecanismo de deteção dos raios gama

À semelhança da técnica de espectroscopia Raman e EDXRF, a deteção da radiação por PIGE é realizada por um detetor semi-condutor. Nestes condutores, a radiação ionizante é medida através do número de partículas carregadas libertadas pela radiação gama no material do detetor, que se encontra entre dois elétrodos. Para evitar o bloqueio da movimentação dos eletrões e a sua recombinação na estrutura, a pureza do cristal semicondutor deve ser máxima, razão pela qual se utiliza um cristal de HPGe (*high purity Germanium*) [93].

Quando a radiação incide sobre o semicondutor, a sua energia é transferida para o material. Estes cristais são constituídos por junções p-n, que possui zonas de valência e de condução capazes de gerar um par eletrão-lacuna. Quando a energia é transferida para o eletrão do detetor, este passa para a banda de condução, deixando uma lacuna na banda de valência. Quando é imposta uma diferença de potencial entre os elétrodos do semicondutor, o eletrão move-se no sentido do ânodo e a lacuna move-se no sentido do cátodo. Como a energia requerida para criar um par eletrão-lacuna é conhecida e é independente da energia da radiação incidente, medir o número de pares eletrão-lacuna criados permite estimar a intensidade da radiação [93].

Assim, uma deteção incompleta da carga acarreta diminuição da intensidade dos picos no espectro de PIGE e conduz, consequentemente, a uma dedução errada da concentração dos elementos presentes.

6.3.2 Erya

A concentração do elemento numa amostra em PIGE é, geralmente, calculada através da comparação do sinal obtido com o de padrões elementares [94]. O *software* ERYA (*Emitted Radiation Yield Analysis*), contudo, permite realizar a análise quantitativa da amostra sem o recurso a padrões.

O utilizador deve começar por introduzir uma matriz inicial e os seus dados estequiométricos, que podem ser apenas baseados no conhecimento químico da amostra ou a partir de informação obtida por PIXE (*Particle Induced X-ray Emission*), e escolher o isótopo que pretende usar e a respetiva emissão gama. O programa possui em base de dados a eficiência do detetor, parâmetros de Ziegler para o cálculo da secção eficaz de paragem, a secção eficaz dos isótopos e a abundância e número de massa dos mesmos. Com todos estes dados, a composição de uma amostra fina é deduzida a partir do rendimento diferencial, dY, para um isótopo do elemento detetado, pela expressão:

$$\mathrm{d}Y = \varepsilon(E_\gamma)\ \frac{Q}{e}\sigma(E)\ f_m\, f_i\ N_{av}\ A^{-1}\ d\Gamma \qquad (6.11)$$

Em que $\varepsilon(E_\gamma)$ representa a eficiência absoluta do detetor para a energia emitida, $\frac{Q}{e}$ representa o número de protões incidentes (razão entre a carga coletada Q e e a carga de um eletrão), , f_m e f_i as frações mássicas e isotópicos do elemento, N_a, o número de Avogadro, A^{-1} o

inverso da sua massa atómica, $\sigma(E)$ a secção eficaz da reação à energia E e $d\Gamma$a espessura do filme.

Para amostras espessas, em que a espessura é superior ao alcance das partículas, o rendimento resulta da integração da equação anterior:

$$Y = \varepsilon(E_\gamma)\ \frac{Q}{e}\ f_m\, f_i\, N_{av}\, A^{-1}\ \int_0^E \frac{d\sigma(E)}{\varepsilon(E)} dE \tag{6.12}$$

Considerando a amostra como uma sobreposição de n camadas paralelas em que a secção eficaz se pode considerar constante, o *software* integra todos os valores de σ dos elementos até à perda total de energia do feixe. Com esta abordagem, o integral da expressão anterior transforma-se em:

$$\sum_n \frac{1}{\epsilon_n} \int_{E_n}^{E_{N+1}} \sigma(E)\ dE \tag{6.13}$$

Posteriormente, é realizada uma rotina utilizando o algoritmo de Levenberg-Marquart, que ajusta todos os rendimentos e afere interactivamente a composição inicial inserida pelo utilizador [92].

6.3.5. Vantagens e limitações

A tabela 6.4 sintetiza as principais vantagens e limitações da técnica PIGE [53].

Tabela 6.4-Vantagens e limitações da técnica PIGE.

Vantagens	Limitações
Técnica não destrutiva e rápida de elementos de baixo Z	Limitada a elementos de baixo Z
Elevada penetrabilidade dos raios gama	Exige conhecimento prévio das energias de ressonância de cada isótopo
Grande sensibilidade (resolução do feixe na ordem de 0.05-1 keV)	Interferência de reações secundárias na matriz e de ressonâncias próximas
Permite a deteção de vários elementos simultaneamente	
Permite análise em profundidade	

6.4 Teste de microdureza de Vickers

A dureza é uma propriedade dos materiais, definida como a resistência à deformação plástica por indentação, aquando da aplicação de uma carga. Os testes de dureza foram desenvolvidos entre 1900 e 1925 e bastante otimizados a nível da produtividade e precisão nas últimas décadas, consistindo atualmente num método rápido e simples de caracterização mecânica, a partir de uma amostra de pequenas dimensões [95] [96].

Os testes de microdureza consistem em testes de medição de dureza baseadas em indentações estáticas com cargas aplicadas inferiores a 1 kgf. Os dois principais testes de microdureza são o teste de Vickers e o teste de Knoop [97].

6.4.1 Princípios Físicos dos testes de microdureza

Os ensaios de dureza são efetuados com recurso a um indentador, que pela aplicação controlada de uma carga penetrará ortogonalmente na amostra de material, até uma dada profundidade. Após o ensaio, é efetuado o recuo do indentador e é medida a área da indentação residual (após descarga) da amostra. A dureza é então calculada através do quociente entre o valor da carga P aplicada e a área de contacto de indentação residual, A_c.

No caso dos testes de microdureza, as cargas aplicadas são muito pequenas, pelo que é necessário determinar de forma precisa a área de indentação. Para tal, é comum recorrer-se a microscópios óticos, que permitem traçar a evolução da carga em função da profundidade de indentação. Esta evolução é traduzida pela curva de carga-descarga.

A figura 6.9 ilustra a curva de carga-descarga típica de um ensaio de dureza. O ensaio inicia-se com a o indentador a penetrar a superfície da amostra por aplicação de uma carga de valor constante. O valor máximo de carga até corresponderá à profundidade de indentação máxima (h_{max}). Durante o ensaio, o material fica sujeito essencialmente a tensões de compressão. Após a manutenção da carga durante um período pré-definido, inicia-se a fase de descarga, que termina quando o indentador deixa de controlar com a superfície da amostra [95].

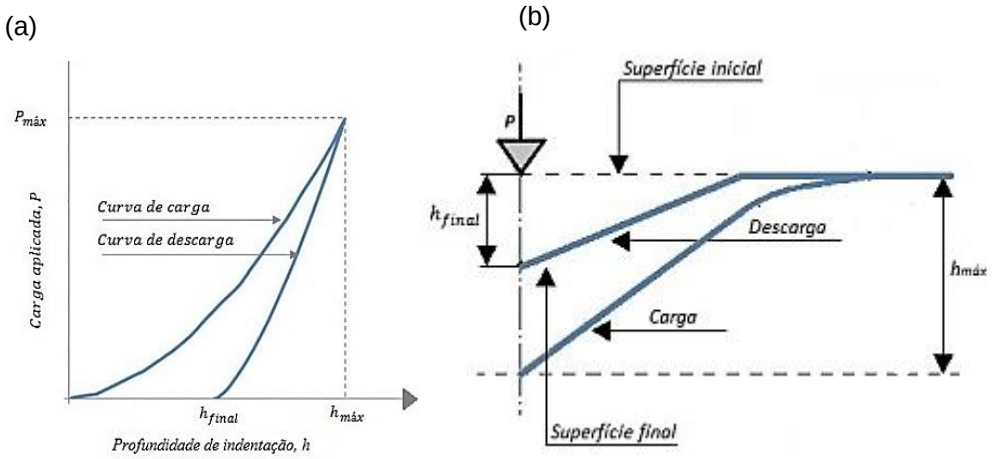

Figura 6.9-Esquemas representativos: (a) curva de carga-descarga de um material elástico/plástico num ensaio de dureza de Vickers; (b) geometrias de indentação antes e após descarga. Adaptado de [95].

6.4.1Indentador e dureza de Vickers (VHN)

O indentador de Vickers consiste numa pirâmide de base quadrada em que o ângulo θ entre os dois lados opostos corresponde a 136º (figura 6.10). A forma do indentador tem a vantagem de verificar a lei da proporcionalidade das resistências, que estabelece que a carga aplicada e a superfície de indentação são proporcionais entre si. Assim, o valor da microdureza registado será independente da carga aplicada [96].

A avaliação da dureza do material é feita com base no número de dureza de Vickers (VHN), que é calculado com base na área projetada de contacto da indentação no plano de material (A_C), quando este é sujeito à carga máxima de indentação. A área projetada é calculada a partir do comprimento das diagonais de indentação, resultando para o valor de VHN:

$$VHN = \frac{P}{A_C} = \frac{\mathrm{P}}{\frac{d^2}{2} sin\frac{\theta}{2}} = 1.8544\frac{P}{d^2} \qquad (6.12)$$

Em que *P* designa a carga aplicada em kgf, *d* a média dos comprimentos das duas diagonais de indentação em mm e 1,8544 é a contante geométrica do diamante piramidal. Pela geometria da pirâmide, a profundidade de indentação equivale a aproximadamente a 1/7 do comprimento das diagonais [98] [96].

O valor de VHN é geralmente apresentado com indicação da duração e da carga aplicada. A título de exemplo, um valor de 240 VHN 10/30 representa um material com número de dureza de Vickers de 240, sujeito a uma carga de 10 kgf por 30 s [96]. As amostras sujeitas ao teste devem apresentar superfície plana, o que implica, geralmente, um processo de polimento do material.

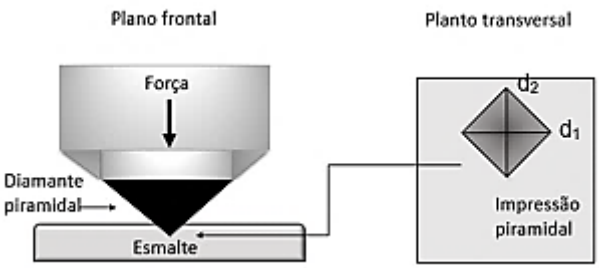

Figura 6.10-Representação esquemático do indentador de Vickers e das diagonais de indentação (d1 e d2).

6.4.3.Vantagens e limitações

A tabela 6.2 sintetiza as principais vantagens e limitações do teste de microdureza de Vickers [96].

Tabela 6.5-Vantagens e limitações da técnica Vickers.

Vantagens	Limitações
Técnica não destrutiva	Grande sensibilidade a impactos e vibrações
Pouco limitada pela dureza, espessura ou tamanho da amostra	Dificuldade de medição das diagonais de indentação e na preparação das amostras
Aplicável a forças de teste muito baixas	Limitado a amostras com superfície plana

7. Materiais e Métodos

Neste capítulo será descrito todo o procedimento experimental e os materiais e métodos envolvidos.

Foram utilizadas um total de 50 amostras, distribuídas por 5 grupos. Os grupos A, B, C, D são compostos por 10 amostras de esmalte intacto, sujeitas a diferentes produtos branqueadores. O grupo AP é um grupo constituído por 10 amostras polidas, expostas ao mesmo produto aplicado no grupo A.

Como será exposto adiante, o método de EDXRF foi abandonado no início do estudo. O teste de micrododureza de Vickers foi aplicada a 8 amostras do grupo de amostras sujeito a polimento. A análise por espectroscopia Raman foi realizada nos 5 grupos, com 10 amostras cada. Devido a problemas experimentais associados às medições de PIGE, abandonou-se um dos grupos de controlo negativo e limitou-se a análise a 8 amostras dos restantes grupos de esmalte intacto e a 7 amostras do grupo de esmalte polido.

A figura 7.1 representa o fluxograma do estudo, enunciando os branqueadores utilizados.

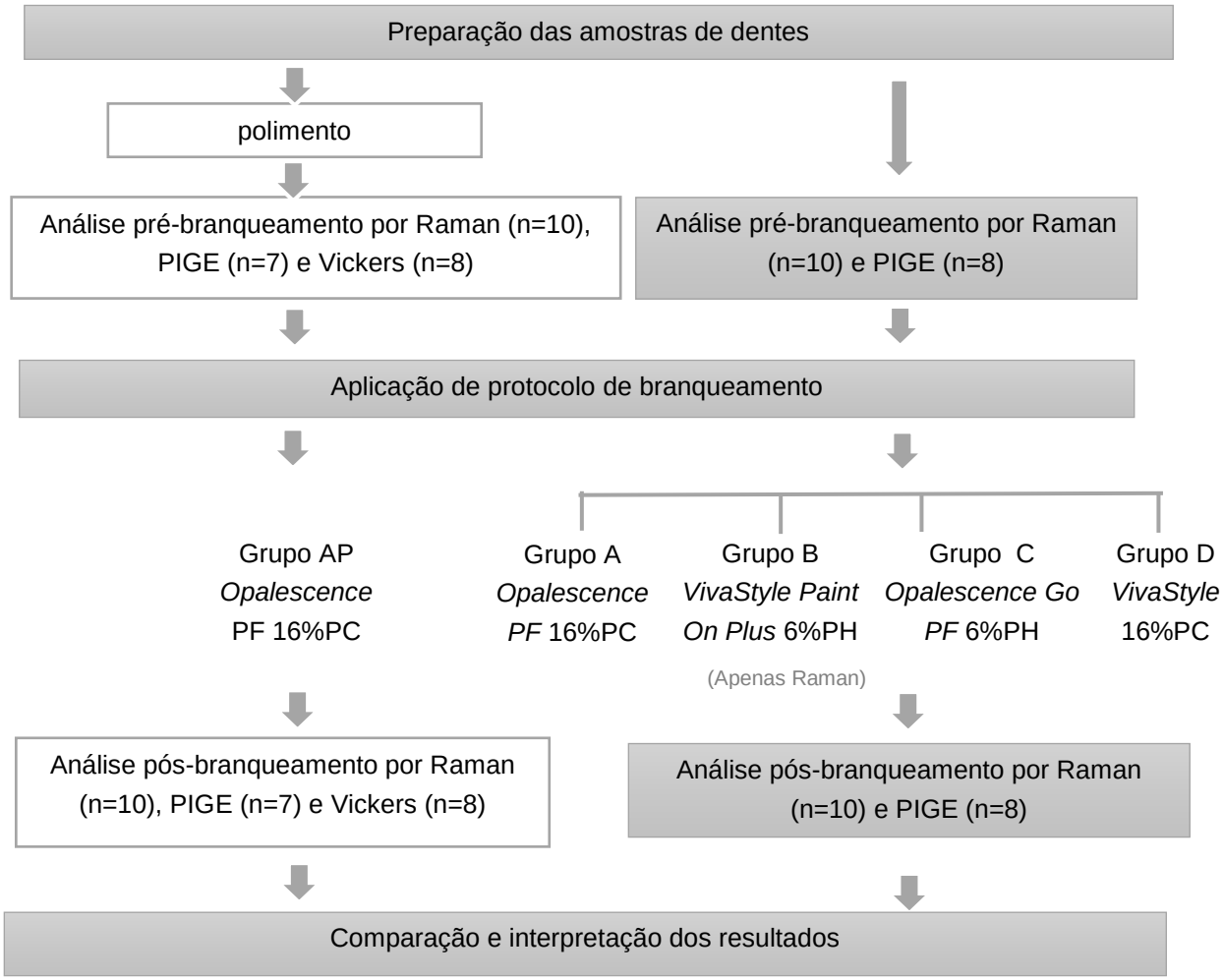

Figura 7.1-Fluxograma do trabalho realizado.

7.1 Preparação das amostras

As amostras utilizadas neste estudo foram provenientes de dentes hígidos extraídos por motivos periodontais ou ortodônticos e conservados no banco de dentes GIBBO-LIBPhys da FMDUL em solução de Cloramina a 0,5% a 4 °C. De forma a selecionar os dentes aptos a constituir amostras, realizou-se a sua análise detalhada através de uma lupa estereoscópica (Meiji Techno EMZ 8RT, Japão), de forma a excluir os exemplares com irregularidades no esmalte ou cariados.

Foram selecionados dentes molares, incisivos e caninos, que foram cortados com uma lâmina de precisão (Buehler Isomet 1000, EUA). Aos molares e pré-molares foi removida a parte oclusal e radicular de forma a obter uma fatia de cerca de 3 mm de espessura. a partir do qual se extraiu o esmalte das faces vestibular e lingual/palatina. Aos incisivos e caninos foi removida apenas face vestibular. As faces foram cortadas de forma a que cada amostra tivesse dimensões entre 3 x 3 mm e 4 x 4 mm e 1 mm de espessura (figura 7.2). Foram preparadas cerca de uma centena de amostras, cada uma reservada num frasco devidamente identificado e conservada numa solução de Cloramina a 0,5% a 4 °C. A identificação de cada amostra inclui um número, que se refere ao dente do qual provém, e uma letra, que permite identificar a face da qual a amostra foi retirada.

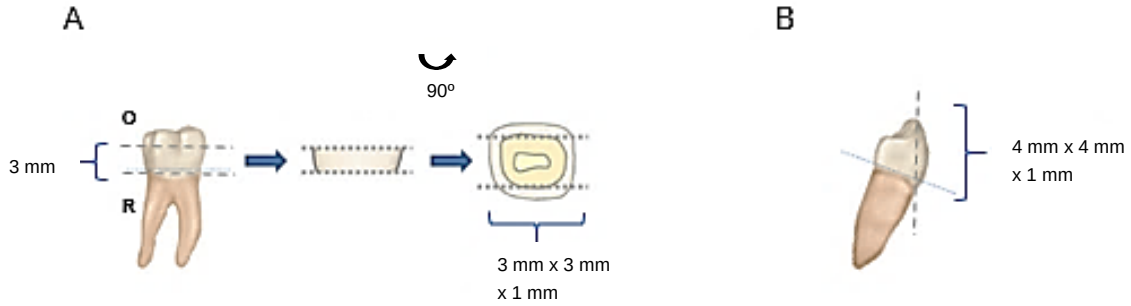

Figura 7.2-Representação esquemática dos cortes realizados para obtenção das amostras. A) Remoção da parte oclusal (O) e radicular (R) de um molar, de forma a obter uma fatia transversal, da qual se extraiu o esmalte das faces. B) Remoção da face vestibular de um incisivo (adaptado de [99]*).*

7.2 Recolha da saliva humana

A saliva humana utilizada no estudo foi recolhida um mês antes do branqueamento e congelada a - 80º. A saliva proveio de alunos voluntários da FCTUNL. Para o procedimento de colheita de saliva os voluntários mastigaram um fragmento de parafilme, de forma a estimular mecanicamente a produção salivar e garantir uma recolha significativa.

Uma vez que a saliva coletada está sujeita a variações de pH e à degradação das proteínas com o tempo, optou-se por descongelar a saliva na medida da quantidade necessária e renová-la semanalmente, de forma a tentar minimizar a perda das suas propriedades [100].

7.3 Produtos branqueadores e protocolo de branqueamento

Foram utilizados quatro produtos branqueadores, cuja composição e propriedades químicas puderam ser aferidos pela própria embalagem ou por folhetos informativos da marca do produto:

Figura 7.3- Fotografia do produto Opalescence PF 16% [130].

Grupo A

Foi utilizado o produto **Opalescence PF 16% PC** para regime em ambulatório (figura 7.3). É constituído por peróxido de carbamida (16%), glicerina, água, ureia, xilitol, carbopol, hidróxido de sódio, EDTA, nitrato de potássio e fluoreto de sódio. A quantidade de fluoreto constitui 0,11% da composição total [101]. Foi aplicado durante 14 dias, 6 horas por dia.

Figura 7.4-Fotografia do produto Vivastyle Paint on Plus [131].

Grupo B

Foi utilizado o produto **VivaStyle Paint on Plus 6%PH** para regime em consultório (figura 7.4). O produto é constituído por álcool, etilcelulose, água, peróxido de hidrogénio (6%), pantenol e aromatizante [102]. Foi aplicado durante 14 dias, duas vezes por dia durante 10 minutos.

Figura 7.5-Fotografia do produto Opalescence Go [132].

Grupo C

O produto utilizado foi **Opalescence Go PF 6% PH** para regime em consultório (figura 7.5)**.** Contém peróxido de hidrogénio (6%), água, xilitol, hidróxido de sódio, EDTA, nitrato de potássio e fluoreto de sódio [103]. O produto foi aplicado durante 10 dias, 90 minutos por dia.

Figura 7.6-Fotografia do produto VivaStyle 16% [133].

Grupo D

Utilizou-se o produto **Vivastyle 16% PC** (figura 7.6) para aplicação em regime de branqueamento ambulatório. A sua composição inclui glicerina (25-50%), água (10-25%), peróxido de carbamida (16%), carbopol (5-10%), nitrato de potássio, hidróxido de sódio, aromatizante, EDTA e sacarina de sódio [40]. Foi aplicado durante 14 dias, 6 horas por dia.

Grupo AP

Foi utilizado novamente o produto **Opalescence PF 16% PC** com o mesmo protocolo de aplicação, mas aplicado sobre dentes polidos.

Após cada aplicação, os dentes foram escovados para eliminar vestígios do produto e conservado em saliva humana, em todos os grupos. Após o fim do protocolo e até ao dia da medição pós branqueamento, os dentes foram retirados da saliva para evitar efeitos de remineralização e enrolados em algodão humedecido, por forma a prevenir a desidratação do esmalte.

7.3 Análise do pH

Para confirmar se o pH do produto se encontra de acordo com o apresentado pelo fabricante, foram utilizadas tiras de pH. Os resultados estão expostos na tabela 7.1.

Tabela 7.1- Valores de pH indicado pelo fabricante e medido com tiras de pH para cada produto branqueador.

Produto	pH segundo fabricante	pH medido
Opalescence 16% PF	6,5	7 ± 0,3
Opalescence 6% PF	5 - 7,2	6,5 ± 0,3
Vivastyle	6,9	5,8 ± 0,3
Paint On Plus	6,5 - 7,5	6,2 ± 0,3

7.4 Análise por EDXRF

A análise por EDXRF foi realizada no LIBPhys-UNL em dois espetrómetros triaxiais de fluorescência de raios X dispersiva em energia. Nesta etapa, serão descritos o equipamento, as condições experimentais e a metodologia aplicada.

7.4.1 Equipamento e condições experimentais

Foram utilizados dois espectrómetros de EDXRF com geometria triaxial, caracterizados pela existência de um ângulo de 90º entre o tubo de raios-X, o alvo secundário de e a amostra: um dispositivo fixo e outro portátil, com diferentes materiais como alvo secundário.

O espectrómetro de EDXRF triaxial fixo utilizado tem como alvo secundário um disco de Molibdénio (Mo). O gerador de raios-X com ânodo de Tungsténio (W) foi operado a 50 kV e 20 mA e com um tempo de aquisição de 1000 s. A radiação característica foi detetada usando um detector Si(Li), arrefecido com azoto líquido.

O dispositivo portátil (figura 7.7), com alvo secundário de ítrio (Y), foi operado a 50 kV e 1 mA com tempo de aquisição de 500 s. A radiação é detetada por um detetor de silício SSD, arrefecido termoelectricamente. Foi utilizado um termómetro para monitorização da temperatura do detetor e uma ventoinha para prevenir o sobreaquecimento. Para evitar a radiação dispersa e melhorar os limites de deteção, são utilizados colimadores de prata blindados com chumbo.

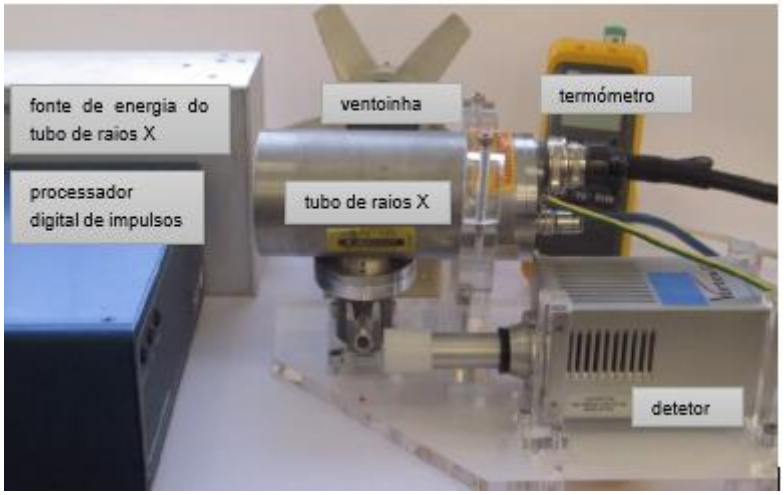

Figura 7.7-Fotografia dos principais componentes do espectrómetro triaxial. Adaptado de [86].

7.4.2 Curva de calibração da intensidade Rayleigh/Compton em função de Z_{ef}

As dispersões de Compton e Rayleigh são dois processos de interação da radiação com a matéria visíveis nos espectros de EDXRF como picos distintos. Sabe-se que a intensidade relativa dos picos de Rayleigh e Compton está relacionada com o número atómico de uma amostra: quanto menor o *Z*, maior a probabilidade de ocorrência de dispersão incoerente relativamente à dispersão coerente, resultando na diminuição da intensidade do pico de Rayleigh relativamente ao pico de Compton [71].

A medição da razão das intensidades dos picos Rayleigh/Compton (R/C) permite, assim, identificar um material apenas pelo seu número atómico, independentemente da densidade do

material ou da atenuação sofrida dentro do mesmo [70]. Se a amostra for uma mistura, associa-se o resultado da razão Raylegh/Compton a um parâmetro denominado Z efetivo (Z_{ef}), que pode ser calculado pela soma do número atómico de cada elemento presente (Z_i) ponderado pela sua percentagem mássica (w_i):

$$Z_{ef} = \sum_i w_i Z_i$$

Com o objetivo de quantificar esta relação, foram realizadas retas de calibração da razão entre as intensidades dos picos R/C em função do número atómico médio, recorrendo a amostras em que este valor era conhecido. As amostras consistiram em pastilhas de 1 g compostas de hidroxiapatite, por forma a reproduzir a composição do dente, e ácido bórico (H_3BO_3) em diferentes concentrações (figura 7.8).

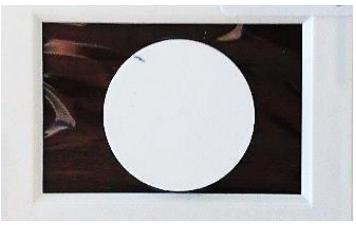

Figura 7.8-Fotografia da pastilha de HAp e H_3BO_3 no porta-amostras, colada em fita de mylar.

O ácido bórico, devido ao seu baixo número atómico, contribui para reduzir o número atómico médio, simulando o efeito de desmineralização. Entre as concentrações de 100% HAp e 100% HB, as proporções dos dois componentes foram variadas em intervalos de 5%, resultando num total de 21 pastilhas de diferente Z_{ef}. Para reduzir a incerteza associada à não homogeneidade da mistura, foram realizadas duas réplicas para cada uma das 21 pastilhas.

Efetuaram-se duas medições por pastilha, utilizando ambos os espectrómetros com geometria triaxial. Para cada amostra, procedeu-se ao cálculo da razão:

$$R/C = \frac{I_{Rayleigh}}{I_{Compton}}$$

Que corresponde ao quociente entre os máximos de intensidade dos picos $K\alpha$ de dispersão de Rayleigh e de Compton do material do alvo secundário (molibdénio ou ítrio), na amostra. Considerou-se a intensidade dos picos proporcional à altura dos mesmos, uma vez que a geometria do espectrómetro permite eliminar a radiação de fundo apresentada nos espectros (figura 7.9).

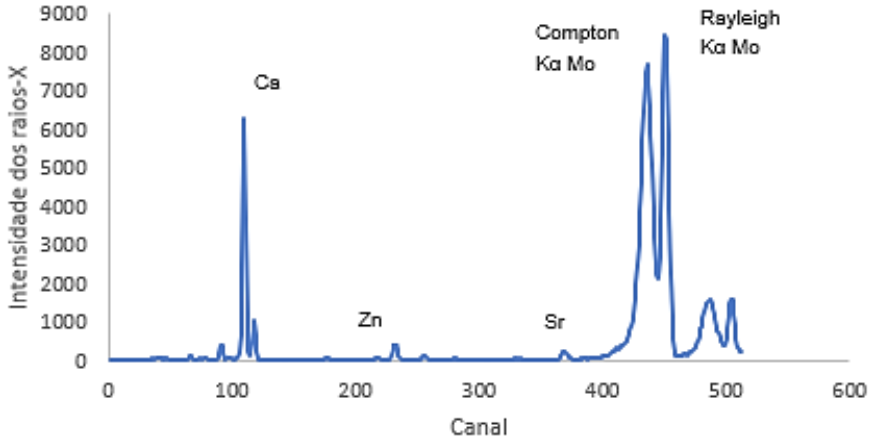

Figura 7.9-Espectro de EDXRF, representando os elementos de maior concentração no esmalte e os picos de dispersão Rayleigh e Compton no alvo secundário. A geometria do espetrómetro permitiu eliminar a radiação de fundo.

Por forma a unir de forma contínua todos os pontos na gama de Z_{ef} entre 7 (100% ácido bórico) e 14 (100% HAp), os pontos experimentais foram ajustados por uma função exponencial. A função de calibração obtida com os dados provenientes do espectrómetro triaxial fixo e triaxial portátil encontram-se representadas na figura 7.10.

As incertezas representadas resultam maioritariamente da variabilidade estatística das contagens do detetor de EDXRF. Outros fatores, como a não homogeneidade das amostras, a concentração de cada elemento e a pureza dos reagentes podem aumentar o valor destas estimativas. As diferenças observadas entre as duas curvas devem-se ao facto de o alvo secundário em cada espectrómetro ser diferente (Y no caso do triaxial portátil e Mo no caso do triaxial fixo).

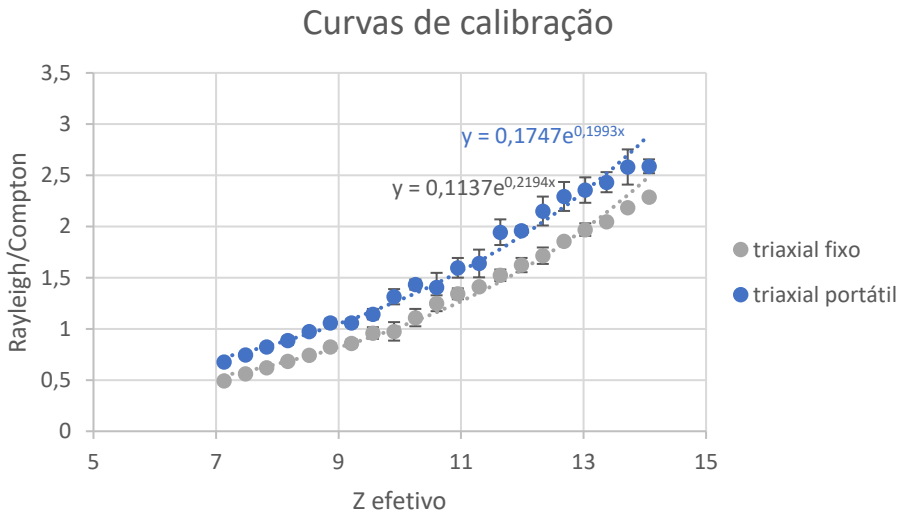

Figura 4.10-Curva de calibração da razão Rayleigh/Compton em função do Zef para os espectrómetros triaxial fixo e portátil.

7.4.3 Análise das amostras de esmalte

Nas medições com espectrómetro de geometria triaxial, cada amostra foi fixa numa folha de *mylar* com fita de carbono. Para cada espécime, foram realizadas 3 medições e calculada a razão entre a intensidade dos picos Rayleigh/Compton. O valor final coincide com o resultado da média aritmética da razão R/C obtida nos 3 espectros.

7.5 Análise de microdureza pelo teste de Vickers

O teste de microdureza de Vickers foi realizado no Laboratório de Biomateriais da Faculdade de Medicina Dentária da Faculdade de Lisboa. Nesta etapa serão descritos o equipamento, as condições experimentais e a metodologia aplicada.

7.5.1 Equipamento e condições experimentais

Foi utilizado o equipamento Struers Duramin (figura 7.11). Cada amostra foi fixada num suporte de resina acrílica, na qual se manteve durante todo o estudo. Para a focagem da amostra, recorreu-se a objetivas de 10x e 40x. O teste foi realizado com uma carga de 100 gf, exercidas durante 10 segundos. Cada amostra foi sujeita a cinco indentações, separadas por uma distância correspondente a três vezes o comprimento de indentação. Foi selecionado um grupo de teste constituído por 55 amostras, sem polimento, com o propósito de obter significância estatística para deduzir um valor médio de dureza para o esmalte e eliminar amostras as discrepantes. Os resultados foram comparados com os valores padrão para a dureza do esmalte nas condições experimentais do teste.

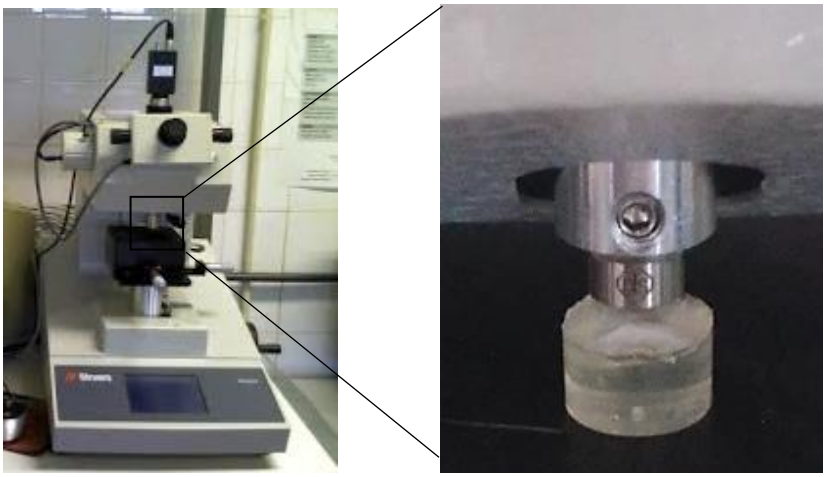

Figura 7.11-Fotografia do equipamento do teste de microdureza e de uma amostra sujeita ao teste de Vickers.

De entre as amostras previamente analisadas, foi selecionado um grupo de 8 e realizado o polimento do esmalte. O procedimento foi realizado com recurso a uma lixa e resultou no aplanamento total da superfície da amostra. As amostras nestas condições foram novamente sujeitas ao teste de Vickers.

7.5.3 Análise de dados

Foi realizada a média dos comprimentos das duas diagonais de cada indentação e calculada a dureza pela fórmula de Vickers (equação 6.12). A dureza de cada amostra foi definida como a média da dureza associada às cinco indentações realizadas.

7.6 Análise por µ-Raman confocal

A análise por espetroscopia de Raman foi realizada no LIBPhys-UNL. Nesta etapa serão descritos o equipamento, condições experimentais e metodologia.

7.6.1 Equipamento e condições experimentais

Foi utilizado o espectrómetro confocal XploRA (Horiba/Jobin-Yvon Xplora, França), acoplado a um microscópio Olympus com objetivas de 10x, 50x e 100x (figura 7.12). Cada espécime foi fixado numa lamela com fita de carbono e colocada no foco da objetiva 100x, sujeito a parâmetros de aquisição que incluem uma fonte de laser díodo de comprimento de onda de 785 nm, um filtro de 50%, um *hole* de 300 µm, um *slit* de 100 µm e um *grating* de 1200 *grooves*/mm, obtendo-se uma resolução em energia de 10 cm^{-1} e espacial de aproximadamente 1 µm. Os espetros foram adquiridos na gama de 200 cm^{-1} a 1300 cm^{-1}, com um tempo de exposição de 20 segundos e 3 acumulações.

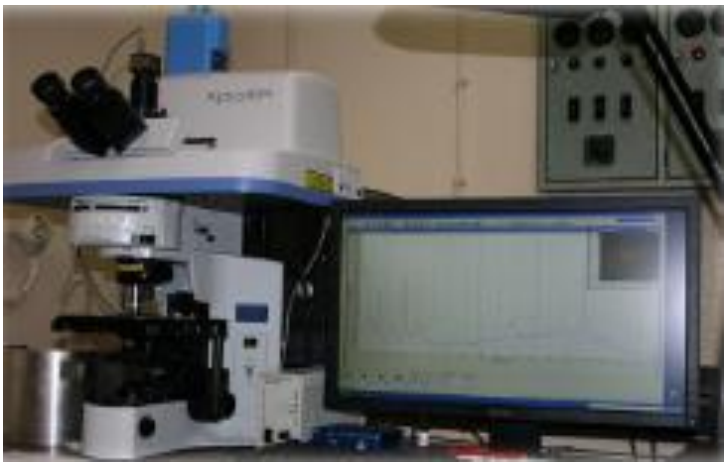

Figura 7.12-Fotografia do espectrómetro confocal XploRA.

7.6.2 Espectroscopia Raman polarizada

Em espectroscopia Raman polarizada, o estado de polarização da radiação é definido com base na posição relativa entre os dois colimadores do equipamento experimental: o polarizador linear e o polarizador analisador. Alterando o ângulo entre os colimadores de 0° para 90°, é possível obter radiação Raman polarizada paralelamente (||) ou perpendicularmente (⊥) ao estado de polarização do laser incidente, respetivamente. A estrutura responsável pela configuração do ângulo de polarização encontra-se representada na figura 7.13.

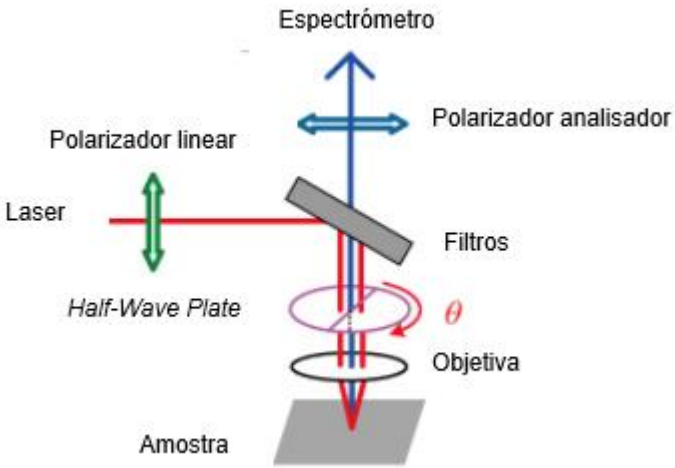

Figura 53-Esquema representativo da estrutura responsável pela configuração do ângulo de polarização da radiação emitida relativamente à incidente. Girando o half-wave plate, altera-se ângulo (ϑ) entre os polarizadores. Adaptado de [104].

Para esmalte são, o pico correspondente ao modo vibracional simétrico v_1 do fosfato a 959 cm^{-1} é anisotrópico. Os espectros do esmalte danificado, por sua vez, apresentam baixa dependência relativamente à polarização da radiação. Estas diferenças podem ser quantificadas através do quociente entre as intensidades dos picos neste comprimento de onda obtidos com polarização perpendicular e paralela relativamente ao laser de excitação. Este quociente é designado de razão de despolarização (ρ) [59].

Para amostras sólidas, o valor de ρ é fortemente influenciado pelo alinhamento molecular, fornecendo informação sobre a simetria vibracional e orientação das moléculas de um espécime. Uma vez que a maioria dos prismas constituintes do esmalte têm uma orientação preferencial no dente, qualquer alteração na sua direção causada por desmineralização é passível de alterar o perfil de espectral polarizado Raman, conduzindo ao aumento do valor de RD (figura 7.14).[59]

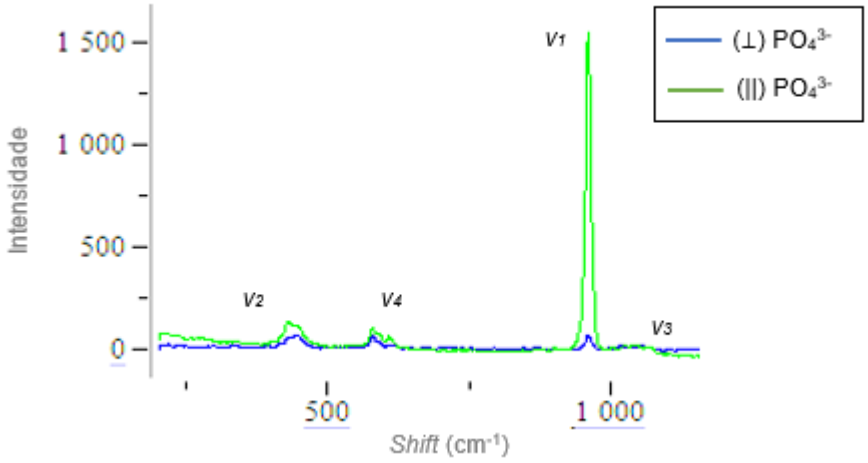

Figura 7.14-Comparação dos espectros obtidos com uma amostra de esmalte com os polarizadores paralelos e perpendiculares entre si. Com a ocorrência de desmineralização, é expectável verificar-se o aumento da intensidade do pico v1 observado com polarização perpendicular, conduzindo ao aumento de ρ.

O método aplicado para a medição da razão de despolarização envolveu, assim, a aquisição de dois espectros, um com polarização paralela e outro com polarização perpendicular à polarização da radiação do laser de excitação, em 20 pontos distintos ao longo de cada amostra. Desta forma, obteve-se um conjunto de dados representativos do estado de desmineralização da amostra como um todo.

7.6.2 Análise de dados

O estudo baseou-se na análise do pico a 959 cm^{-1}, correspondente ao modo vibracional de elongação simétrica v_1 do grupo fosfato da hidroxiapatite. Recorrendo ao *software* LabSpec (Horiba/ Jobin-Yvon Xplora, França), foi realizada a suavização do espectro, corrigida a linha de base removendo o fundo de fluorescência e calculado o integral da banda correspondente ao pico em estudo.

A razão de despolarização foi calculada segundo:

$$\rho_{9590} = \frac{I_{959}\ (\perp)}{I_{959}\ (||)}$$

Onde, I_{959} (⊥) e I_{959} (||) são os integrais dos picos de intensidade da banda Raman a 959 cm^{-1} utilizando polarização perpendicular e paralela entre a radiação incidente e dispersa pela amostra, respetivamente.

7.7 Análise por PIGE

A análise por PIGE foi realizada no Campus Tecnológico e Nuclear do Instituto Superior Técnico (CTN/IST) no acelerador eletrostático Tandem de 3 MeV. Nesta etapa será descrito o equipamento, condições experimentais e metodologia aplicada.

7.7.1 Equipamento

O acelerador Tandem cria um feixe de iões que serão tornados positivos, acelerados orientados e focados ao longo do percurso do mesmo, até à câmara de reações nucleares. A figura 7.15 representa esquematicamente a estrutura do acelerador e os seus principais elementos.

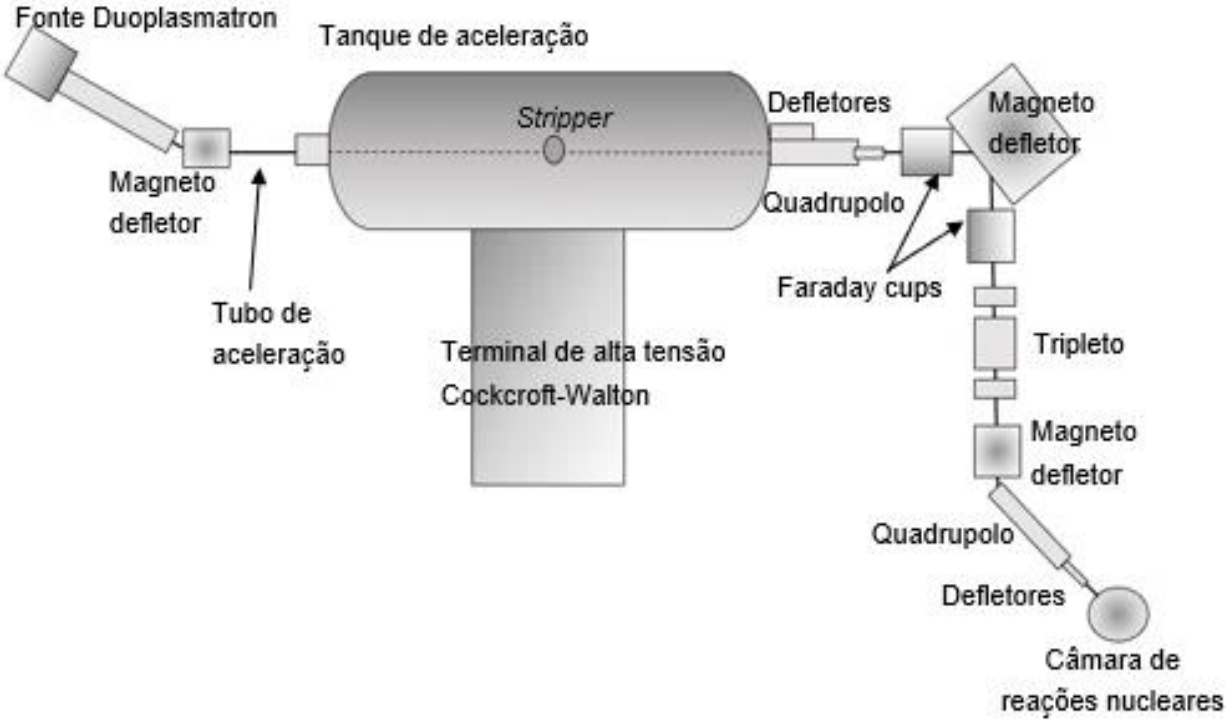

Figura 7.15-Esquema representativo do acelerador Tandem. Adaptado de [92].

A primeira linha de montagem, responsável pela criação e aceleração do feixe que irá interagir com a amostra, envolve os seguintes elementos:

- fonte Duoplasmatron, que cria fonte de iões de hidrogénio negativos;
- tubos de aceleração, onde o feixe criado pela fonte é acelerado, deflectido e focado até ao tanque do acelerador;
- fonte de alta tensão Cockcroft-Walton de 3 MV, à entrada do tanque do acelerador, que cria um elevado potencial positivo, responsável por acelerar os iões negativos;
- canal de Stripper, localizada no centro do tanque, que é um alvo gasoso onde os iões perdem os eletrões fracamente ligados, tornando-se positivos.

Os iões irão sofrer uma aceleração adicional pelo potencial positivo até à saída do acelerador, onde entram numa nova linha de montagem. Esta linha, responsável por direcionar e focar o feixe até à câmara de ionização, inclui:

- Sistema de colimadores;
- *Faraday cup*, para medir a intensidade do feixe de partículas;
- Quadrupolos, para focar o feixe antes de atingir o colimador à entrada da câmara;
- Deflectores eletrostáticos para orientar o feixe;
- Colimador à entrada da câmara;
- Câmara de reações nucleares [92].

No interior da câmara de reações nucleares encontra-se um detetor ORTEC Hiper-Puro de Germânio (HPGe) de 64 x 62,6 mm, com resolução de 1,76 keV e a eficiência intrínseca de 45 % para a deteção da risca de 1,33 MeV do ^{60}Co. Está colocada a um ângulo de 120º e 55,5 mm do ponto de interação (figura 7.16) [105].

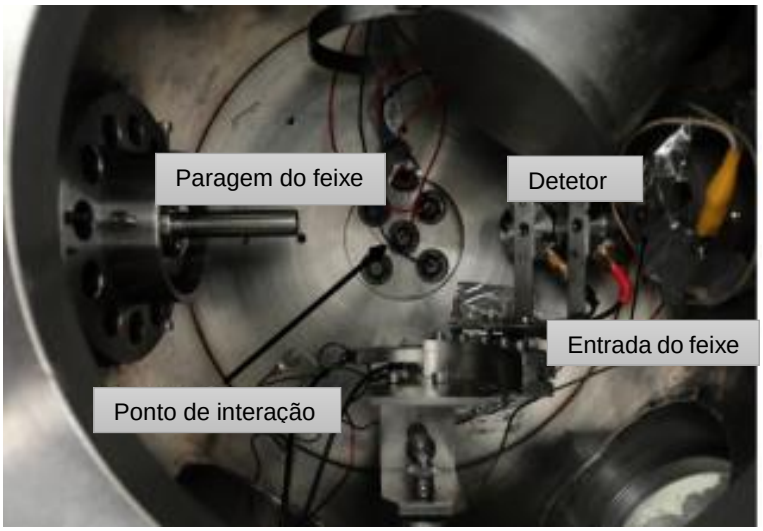

Figura 7.16-Fotografia do interior da câmara de reações nucleares. Adaptadode [92]..

7.7.2 Condições experimentais

Definiu-se a energia do feixe de protões com energia de 3,1 MeV, que corresponde a uma tensão de 1555 keV. A corrente utilzada foi aproximadamente de 5 nA. A carga total coletada foi de 1 ou 2 μC por medição. Foram adquiridos dois ou três pontos por amostra.

As amostras foram colocadas num porta-amostras especialmente concebido para albergar os dentes colocados na resina, uma vez os existentes não permitiam a colocação do dente alinhada com a superfície. A figura 7.17 apresenta o desenho do porta-amostra e as suas respetivas dimensões e uma fotografia dos mesmos colocados no suporte. A altura da abertura para a colocação do dente variou entre 4 e 6 mm, devido às diferentes alturas das amostras. Os porta-amostras foram feitos de alumínio ou cobre e no fundo foi feito um pequeno furo para evitar que a amostra ficasse presa por efeito do vácuo exercido na câmara.

A posição do centro de cada dente foi medida e registada e os porta-amostras fotografados antes e após cada medição, de forma a garantir que, após o branqueamento, a região abrangida pelo feixe (área de 2 mm x 2 mm) seja sensivelmente a mesma que a medida antes do branqueamento. Desta forma, evitam-se variações associadas à variabilidade de F ao longo do comprimento do dente.

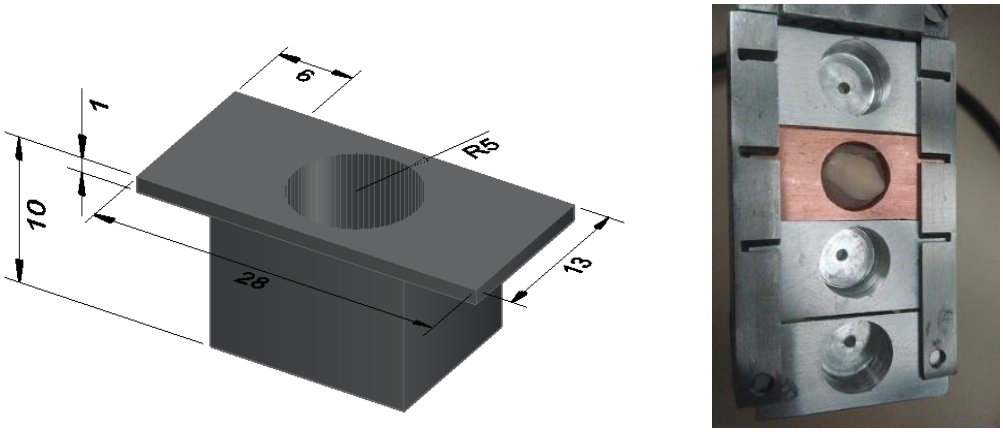

Figura 7.17-Representação do porta-amostras e suas dimensões, com as cotas apresentadas em mm (esquerda) e fotografia dos porta-amostras colocados no suporte (direita).

7.7.2 Simulações

Para simular o alcance dos protões de 3100 keV numa matriz de HAp recorreu-se ao *software* SRIM. Inserindo os dados estequiométricos da HAp e definindo o alvo como uma camada espessa, verifica-se que o feixe atinge profundidades de 148 µm e projeção lateral de 4,26 µm na amostra de esmalte, como se encontra representado na figura 7.18. Pode-se, assim, concluir que o feixe atinge uma profundidade considerável de esmalte prismático.

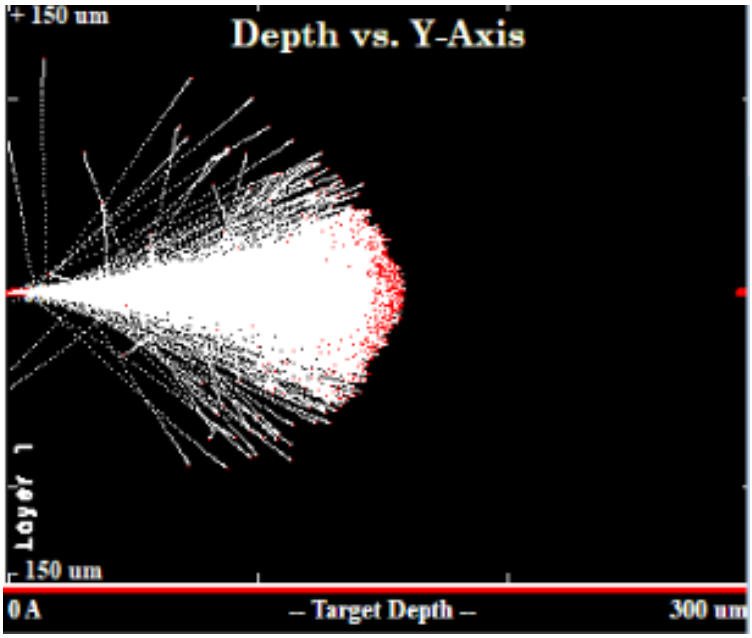

Figura 7.18-Simulação do alcance do feixe de protões de 3,1 MeV numa matriz de HAp.

7.7.3 Análise dos dados

7.7.3.1Identificação dos elementos

Para identificar cada pico, realizou-se a uma reta de calibração que associa a cada canal um valor de energia, representado na figura 7.19. A reta foi definida através da identificação de picos conhecidos no espectro de esmalte. Após a realização da calibração em energia, foi possível reconhecer cada elemento imediatamente pela sua posição no espectro.

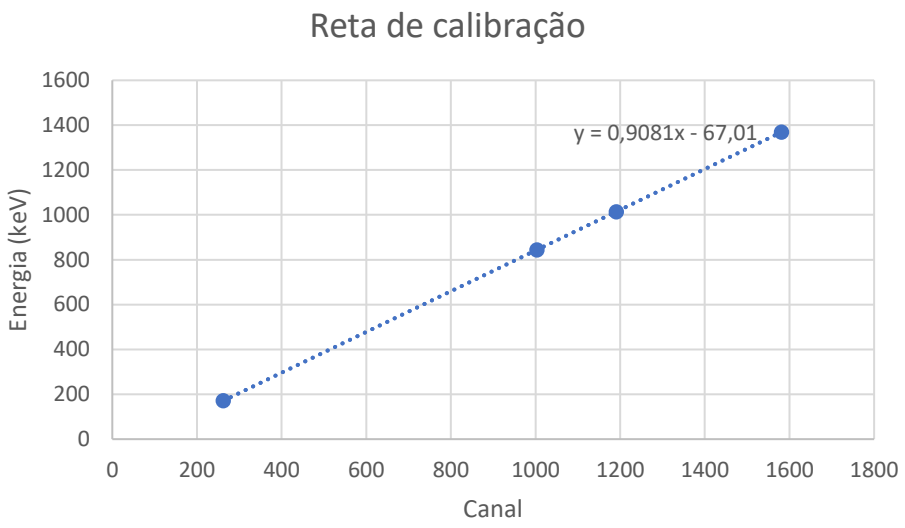

Figura 7.19-Reta de calibração da energia da radiação em função do canal em que surge no espectro.

Para calcular a intensidade de cada pico associada a um elemento, definiu-se um *Region of Interest* (ROI) e calculou-se o seu integral. Recorreu-se ao *software* OriginPro 6 para a análise dos espectros, que incluiu a remoção do fundo de base e o ajuste do pico associada a cada elemento por uma função gaussiana. Foram analisados os picos correspondentes aos elementos ^{31}P, Na e F (figura 7.20.).

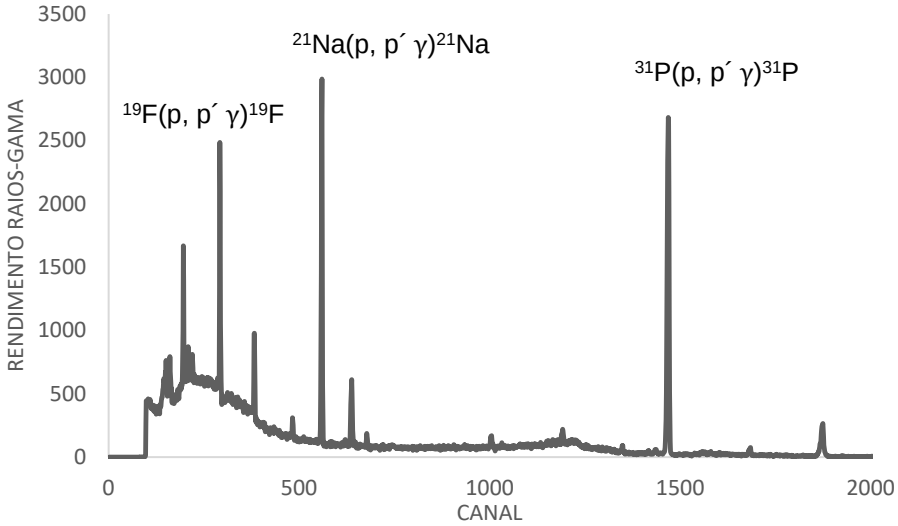

Figura 7.20-Espectro de PIGE com os elementos em estudo destacados.

7.7.3.2 Quantificação dos elementos

A quantificação dos elementos leves presentes no dente é deduzida a partir da intensidade dos picos associados a cada elemento nos espectros. Para a dedução correta do rendimento da reação ($Y_{corrigido}$) é, no entanto, necessário fazer a correção da área dos picos de ressonância (Y), normalizando o resultado para uma carga de 1 μC e tendo em consideração o tempo morto (TM) do detetor:

$$Y_{corrigido} = \mathrm{TM}\ \mathrm{x}\ \frac{Y}{carga}$$

Seguidamente, na interface do *software* ERYA, foram introduzidos estimativos da fração atómica de cada elemento, considerando a estequiometria da HAp e valores aleatórios para a concentração de F e Na. Foram igualmente inseridos o valor de energia de cada pico de ressonância e os valores de $Y_{corrigido}$ de cada um deles, obtido com a energia máxima de 3100 keV (tabela 7.2). Considerando estes dados, o *software* calcula iterativamente a concentração, em μg/g, de cada elemento, ajustando a fração atómica consoante a intensidade dos picos.

Tabela 6.2-Dados inseridos no software ERYA para a dedução da fração mássica de cada elemento.

Elemento	Energia gama (keV)	Fração atómica	Rendimento
Ca		0,2273	
P	1266	0,1364	Área do pico
O		0,5909	
H		0,0255	
F	197	0,0100	Área do pico
Na	440	0,0100	Área do pico

Aplicando este método, verificaram-se discrepâncias entre o valor obtido com o *software* para a concentração de fósforo (P) nas amostras de esmalte relativamente ao expectável. Além disso, observaram-se diferenças entre a concentração de fósforo registada antes e após branqueamento, a qual se deveria manter aproximadamente contante.

Assim, efetuou-se a medição do espectro da amostra padrão de *Bone Ash*, de modo a verificar a precisão da técnica. Compararam-se os resultados obtidos com os valores de concentração registados sabendo que, com exceção da concentração dos elementos F, Al e Na, todos os valores se encontram certificados. Os resultados encontram-se representados na tabela.7.3. O certificado do *National Institute of Standards and Technology* (NIST) encontra-se no apêndice A.

Tabela 7.3-Comparação da concentração dos elementos obtidos com o ERYA com os valores certificados do Bone Ash.

Elemento	Pico	ERYA (µg/g)	NIST (µg/g)
Ca	-	406846	381800 ± 1300
P	1266	74270 ± 16027	179100 ± 1900
O	-	504893	-
H	-	2208	-
K	-	198	168 ± 8
Fe	-	703	660 ± 27
Zn	-	193	181 ± 3
Sr	-	266	249 ± 7
Pb		10	9,07 ± 0,12
Mg	-	7193	684 ± 13
F	197	650 ± 33	1250
Al	844	114	530
Na	440	2457 ± 458	6000

Verifica-se que a concentração dos elementos P, Na e F encontra-se abaixo do registado no certificado. Pensa-se que este facto está relacionado com a ausência de gaiola de Faraday na câmara e com a posição do detetor, que se encontra adaptada para a medição de alvos finos. A geometria atual da câmara de reações nucleares leva a que nem todos os eletrões secundários decorrentes da reação do feixe com a amostra (alvo espesso) sejam detetados, conduzindo à deteção incompleta da carga coletada. Esta configuração não pôde ser alterada devido à realização de outros trabalhos de investigação, paralelamente a este estudo. Deduz-se também

que, devido à alteração do rendimento associada ao P nas mesmas amostras antes e após o branqueamento, a geometria tenha sido alterada durante este intervalo de tempo.

Dada a impossibilidade de deduzir o valor absoluto da concentração de F, recorreu-se à razão entre o rendimento medido para F relativamente ao rendimento medido para P (razão F/P) para estimar a variação da concentração de F antes e após tratamento. Assumiu-se que as variações do número de contagens devido à geometria da câmara de reações nucleares serão uniformes para todos os elementos e que o rendimento associado a P se mantém constante. Assim, é esperado um aumento da razão F/P nas amostras sujeitas a tratamento com produtos fluoretados e a manutenção do mesmo valor nos grupos sem F.

Adicionalmente, averiguou-se se a resina na qual as amostras se encontram fixas influenciava as medições. Os resultados da razão F/P e Na/P (razão entre o rendimento associado ao Na e ao P) encontram-se na figura 7.21, indicando que não há alteração da concentração relativa dos dois elementos relativamente ao fosfato.

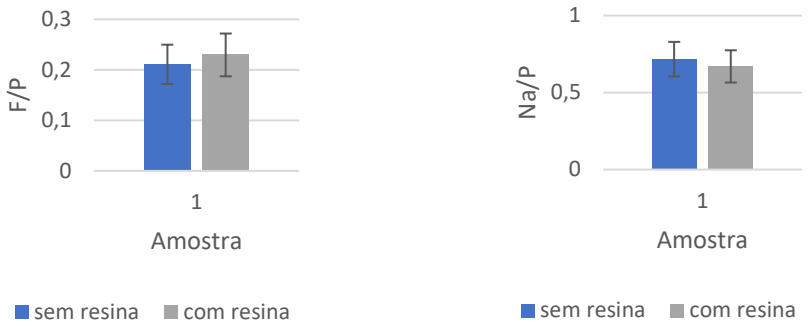

Figura 7.21-Variação da razão F/P e Na/P para uma amostra de esmalte antes e após fixação no suporte de resina.

7.7.3.3 Incerteza

A incerteza associada à concentração de F envolve a incerteza estatística e a incerteza absoluta da medição.

A incerteza estatística da medição inclui a incerteza associada à reprodutibilidade (2%) e a incerteza definida por $\frac{\sqrt{área}}{área}$, e a incerteza associada à área do pico em análise (3%).

A incerteza absoluta é a incerteza associada à eficiência absoluta do detetor, secção eficaz e poder de paragem, apresentadas na tabela 7.4, para cada elemento. A incerteza associada à eficiência do detetor foi determinada previamente com recurso a fontes radioativas, Bario-133, Cobalto-56 e Európio-152 [106].

Tabela 7.4- Tabela de incertezas absolutas associadas a cada elemento.

Elemento	Eficiência absoluta	Secção eficaz	Poder de paragem
F	5%	12%	5%
Na	5%	8%	5%
P	3%	8%	5%

A incerteza do quociente F/P foi calculado considerando a incerteza do rendimento dos dois elementos, através da fórmula da propagação das incertezas associada à divisão.

8. Resultados e Discussão

8.1 Resultados do estudo de EDXRF

8.1.1 Análise do esmalte

Os resultados obtidos com o equipamento de EDXRF geometria triaxial fixo encontram-se representados na figura 8.1.

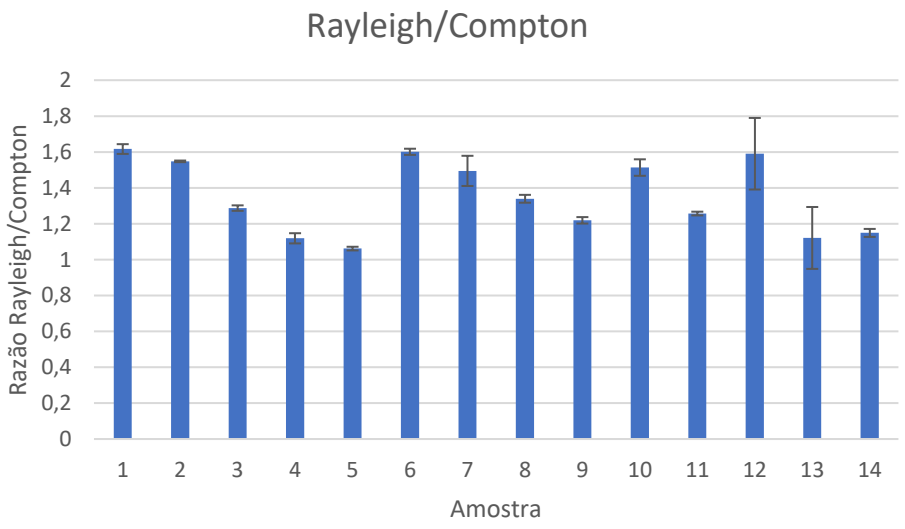

Figura 8.1-Resultados da análise da razão Rayleigh/Compton para 14 amostras de teste.

Os resultados obtidos foram considerados não representativos do número atómico médio da amostra e o estudo abandonado ainda durante a análise pré-branqueamento. Considerando a função de calibração obtida, e tendo em conta que o esmalte é maioritariamente constituído por HAp, esperar-se-ia obter valores próximos de 2,3 para a razão Rayleigh/Compton, o que não se verificou. A variabilidade dos resultados observados entre amostras corrobora a hipótese de

que a análise seria inconclusiva. Não é apresentada uma verdadeira justificação para o abandono da técnica.

A discrepância entre os valores esperados e os obtidos pode ser atribuída ao diâmetro do feixe de raios X incidente (1,5 cm x 2,0 cm), largo o suficiente para grande parte do volume do espécime. A curvatura do esmalte e as diferenças de geometria entre amostras podem ter afetado a intensidade do pico Compton, que se sabe estar fortemente dependente do ângulo de incidência da radiação no espécime.

Resultados semelhantes foram obtidos por Cândido [107] que, após sujeição de amostras de esmalte a desmineralização causada por refrigerantes ácidos, não observou a esperada redução da razão de Rayleigh/Compton nos espectros de EDXRF triaxial. Os resultados foram justificados pelo facto de alterações micrométricas na matriz da HAp não serem abrangidas pela sensibilidade da técnica.

O recurso a um espectrómetro com micro-feixe, que permitisse uma análise pontual, poderia contornar as limitações associadas à geometria da amostra e à largura do feixe. Durante o período de trabalho, este equipamento encontrou-se indisponível, impossibilitando a realização deste estudo.

8.2 Resultados do teste de microdureza de Vickers

8.2.1 Esmalte não polido

Os valores medidos para 10 amostras de teste pelo teste de microdureza de Vickers encontram-se na figura 8.2.

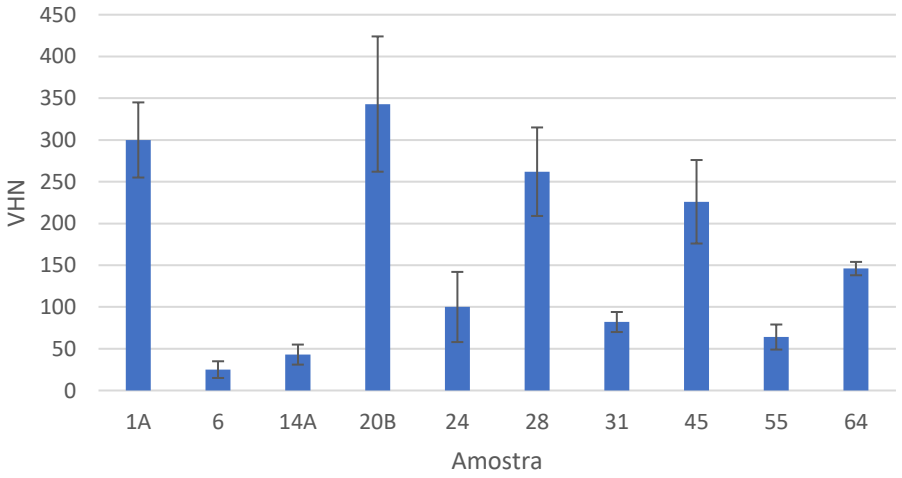

Figura 8.2-Valores de dureza de Vickers (VHN) medidas para 10 amostras de teste.

De acordo com a literatura, é esperado que os valores de dureza do esmalte obtidos pelo teste de microdureza de Vickers se encontrem entre 250 e 360 VHN [108]. Craig e Peyton [109] registaram valores entre 344 ± 49 a 418 ± 60; Collys *et al.* [110] entre 360 ± 25 a 431 ± 35 e

Wilson e Love [111] de 263 ± 26 a 327 ± 40. Contudo, os resultados pré-branqueamento resultantes da análise das amostras sem polimento revelaram valores de dureza muito inferiores aos mencionados e com grandes variações entre amostras, como se pode verificar pelos resultados de 10 amostras de teste ilustradas na figura 8.2 e para as restantes 45 amostras medidas, expostas no apêndice B.

Os resultados discrepantes estão relacionados com a deformação da impressão do indentador deixada no esmalte, causada pela curvatura do mesmo. Havendo alteração da geometria quadrangular, a expressão para o cálculo da dureza de Vickers perde a validade, conduzindo a resultados não representativos da dureza do esmalte.

Acho que seria aqui poderias justificar o porquê de teres feito um grupo polido. Seria pertinente.

8.2.1 Esmalte polido

Os resultados obtidos com o teste de microdureza de Vickers aplicado antes e após branqueamento às amostras do grupo AP encontram-se representado na figura 8.3.

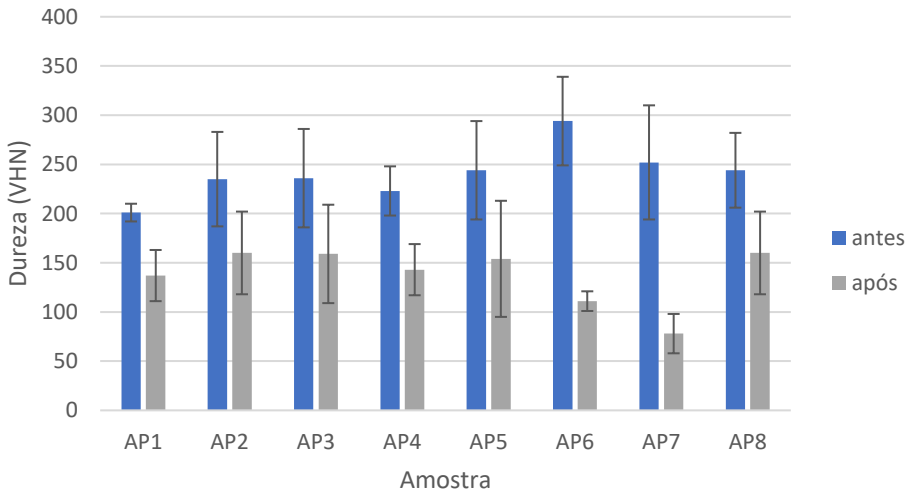

Figura 8.3-Resultados do teste de Vickers antes e após branqueamento para as amostras do Grupo AP.

Após o branqueamento, verifica-se a diminuição do valor médio do VHN para todas as amostras. Os resultados obtidos foram analisados pelo teste t-student e emparelhados com recurso ao software SPSS, considerando uma significância estatística para $p<0,05$. Verifica-se uma perda de dureza estatisticamente relevante ($p<0,001$), com o valor médio medido antes de 237 ± 41 e após 145 ± 47 VHN (Apêndice C).

A tabela 8.1 apresenta a percentagem de diminuição de dureza verificada em todas as amostras.

Tabela 8.1-Redução em percentagem do valor de dureza para cada amostra.

Amostra	Redução em VHN (%)
AP1	31,8
AP2	31,9
AP3	32,6
AP4	35,9
AP5	36,9
AP6	62,2
AP7	69,0
AP8	34,4

Na literatura, os resultados dos testes de microdureza aplicados ao esmalte sujeito a produtos branqueadores com F divergem, existindo registos manutenção do mesmo valor de dureza[52] [58], do seu aumento relativamente ao valor de controlo [53][54], e de uma diminuição de dureza equiparável ao verificado com produtos sem F [55]. Contudo, a maioria dos estudos parece registar uma diminuição da perda de dureza dos branqueadores com F relativamente aos não fluoretados [56] [57] [51]. Estas variações devem-se a diferenças no *design* do estudo: são utilizados diferentes testes (Knoop ou Vickers), com diferentes tempos e força de indentação. Maiores forças podem conduzir à penetração do cristal para profundidades em que o esmalte não é afetado pelo branqueamento, conduzindo a resultados antes e após branqueamento similares [58]. As condições experimentais são também diferentes entre estudos, nem sempre se utilizando saliva humana entre os intervalos de aplicação.

Na região entre 100 a 600 µm de distância da região amelodentinária, a dureza oscila entre 2 e 2,5 GPa[112], o equivalente a 204-255 VHN. Considerando os resultados pré-branqueamento obtidos (figura 8.3), é provável que, após o polimento, as amostras de esmalte com menor espessura de esmalte tenham exibido à superfície esta região de menor dureza.

As variações entre dentes podem igualmente ser atribuídas à região do dente em que são realizadas as medições, à idade do dente, e ao facto de o polimento não ter sido uniforme em todas as amostras. O esmalte é mais fino na região da raiz do que na coroa, o que leva a que a dureza varie ao longo do seu comprimento [3]. Por outro lado, o conteúdo mineral do dente aumenta com idade, pelo que se verifica um aumento da dureza em dentes permanentes mais antigos, relativamente aos recentes [113].

A diminuição do valor médio de VHN oscilou entre 32-37% para a maioria das amostras. As amostras AP6 e AP7 registaram a maior diminuição, de 62 e 69%, respetivamente. O motivo para se verificar esta diferença apenas para duas amostras é desconhecido, não parecendo estar

relacionado com um valor anormal da concentração relativa de F nestas amostras, determinada posteriormente por PIGE.

Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira *et al*. [55], que registaram diminuições de dureza entre 45% e 52% após 14 dias de branqueamento com um produto de 10%PC, mesmo com a adição de Ca e F em concentrações até 0,5%. Contudo, manteve-se a hipótese que a adição de F pode prevenir a suscetibilidade a estímulos cariogénicos posteriormente ao branqueamento. Attin *et al*. [56] verificaram igualmente redução da dureza em produtos 10% PH com e sem F, mas registaram uma diminuição de 12% em produtos ácidos sem F e de 23% em produtos neutros com F. Estes resultados sugerem que o elemento pode assumir um papel protetor, mesmo não evitando totalmente a perda de dureza.

Nascimento *et al*. [57] constatou que a perda de dureza obtida com o branqueador 35%PH era insignificante em produtos ácidos ou neutros com 2% de NaF adicionados, mas relevante para branqueadores com apenas 1,3% de NaF. Assim, pode colocar-se a hipótese de a concentração de F no produto Opalecence 16% PF utilizado neste estudo não se encontrar na sua concentração ótima para a prevenção total do efeito de perda de dureza.

Por outro lado, Araujo *et al.*[114] verificaram que, após 14 dias do final do branqueamento com gel de PH com pH neutro, as amostras recuperaram a dureza perdida até aos valores iniciais devido ao efeito remineralizador da saliva. Lewinstein *et al*.[58] constatou que a exposição a pequenas concentrações de F após o branqueamento também contribui recuperar a perda de dureza. Estes resultados apontam para a possibilidade de reverter os efeitos verificados.

Além disso, a necessidade de seccionar e polir as amostras para a realização do teste de microdureza altera a morfologia natural do esmalte, afastando-o das condições *in vivo*. Este fator deve igualmente ser tido em consideração antes de extrapolar os resultados para o contexto clínico.

8.3 Resultados do estudo por espectroscopia Raman

Neste capítulo serão expostos e discutidos os resultados obtidos para a análise do esmalte por espectroscopia Raman para cada um dos grupos experimentais.

8.3.1 Razão de despolarização

- **GrupoA**

Os resultados obtidos e a respetiva incerteza encontram-se representados na figura 8.4.

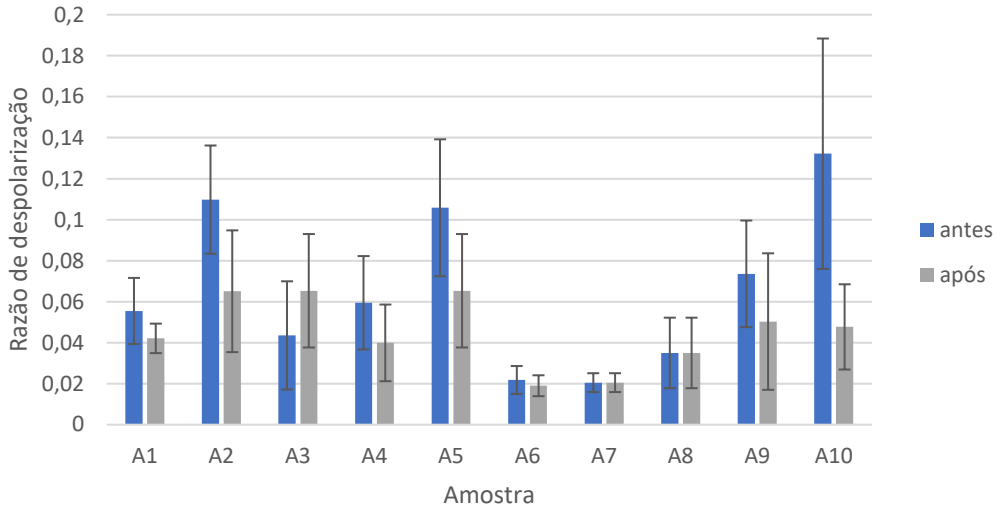

Figura 8.4-Resultados da razão de despolarização antes e após branqueamento para as amostras do Grupo A.

Neste grupo, parece haver uma tendência para as amostras com maiores valores de razão de despolarização inicial registarem diminuição deste quociente após branqueamento. Na amostra A10, em particular, esta diminuição é bastante evidente, não havendo interseção das barras de incerteza antes e após branqueamento. O valor médio da razão de despolarização neste grupo foi de 0,06 ± 0,04 antes do branqueamento e de 0,04 ± 0,02 depois, apontando para um efeito de remineralização após tratamento.

- **Grupo B**

Os resultados obtidos e a respetiva incerteza encontram-se representados na figura 8.5.

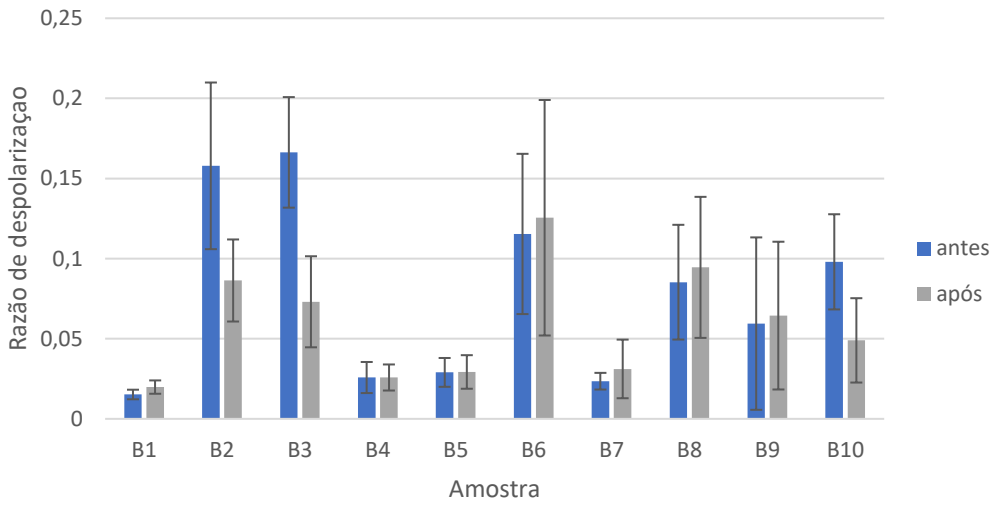

Figura 8.5-Resultados da razão de despolarização antes e após branqueamento para as amostras do Grupo B.

Neste grupo, volta a verificar-se a mesma tendência verificada no grupo A: amostras com valores de despolarização acima do esperado (B2, B3, B10) para o esmalte verificam uma redução significativa do seu valor médio. A única exceção corresponde à amostra B6. As amostras de baixo ρ inicial mantiveram o seu valor médio praticamente inalterado. A média para os valores medidos corresponde a 0,08 ± 0,05 antes e 0,06 ± 0,05 após o branqueamento.

- **Grupo C**

Os resultados obtidos e a respetiva incerteza encontram-se representados na figura 8.6.

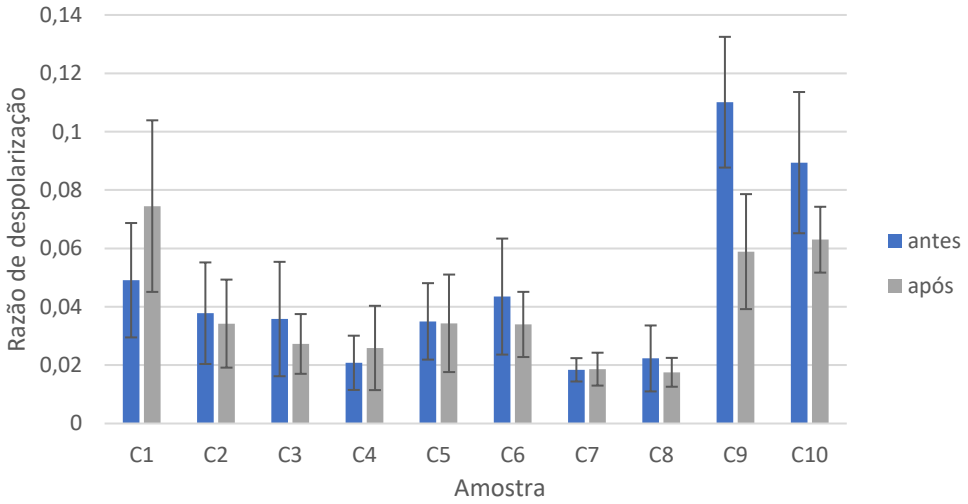

Figura 8.6-Resultados da razão de despolarização antes e após branqueamento para as amostras do Grupo C.

Neste grupo, os resultados voltam a manter-se constantes antes e após branqueamento para a maioria das amostras. As amostras C9 e C10, com elevado valor de ρ inicial, verificarem uma diminuição deste valor após branqueamento. O valor médio para o grupo C foi de 0,05 ± 0,03 antes e 0.03 ± 0.02 após o branqueamento, apontando para a remineralização do esmalte.

- **Grupo D**

Os resultados obtidos e a respetiva incerteza encontram-se representados na figura 8.7.

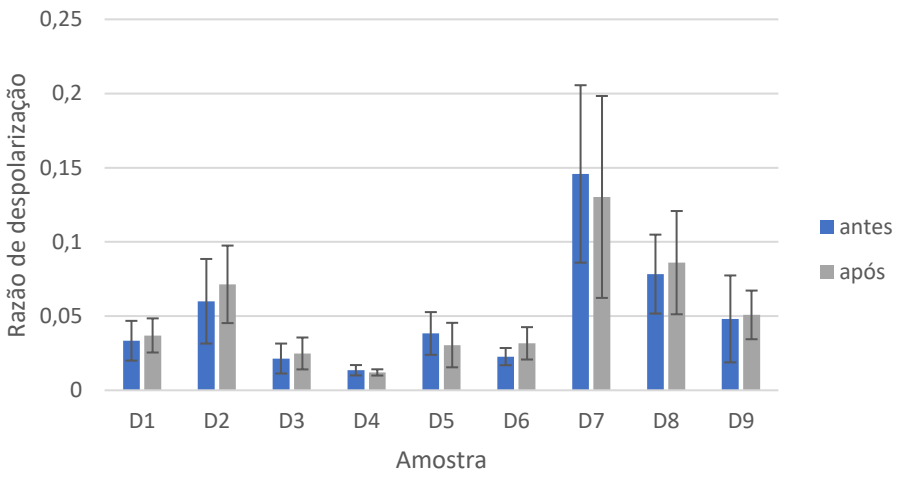

Figura 8.7- Resultados da razão de despolarização antes e após branqueamento para as amostras do Grupo D.

Não se verificou alterações da razão de despolarização significativas para nenhuma das amostras. A amostra D10 foi desprezada devido à sua danificação durante análises prévias. O valor médio foi de 0,05 ± 0,04 antes e depois do branqueamento.

- **Grupo AP**

O grupo AP corresponde ao protocolo de branqueamento que envolveu os dentes polidos. Os resultados da análise Raman antes e após polimento encontram-se na figura 8.8.

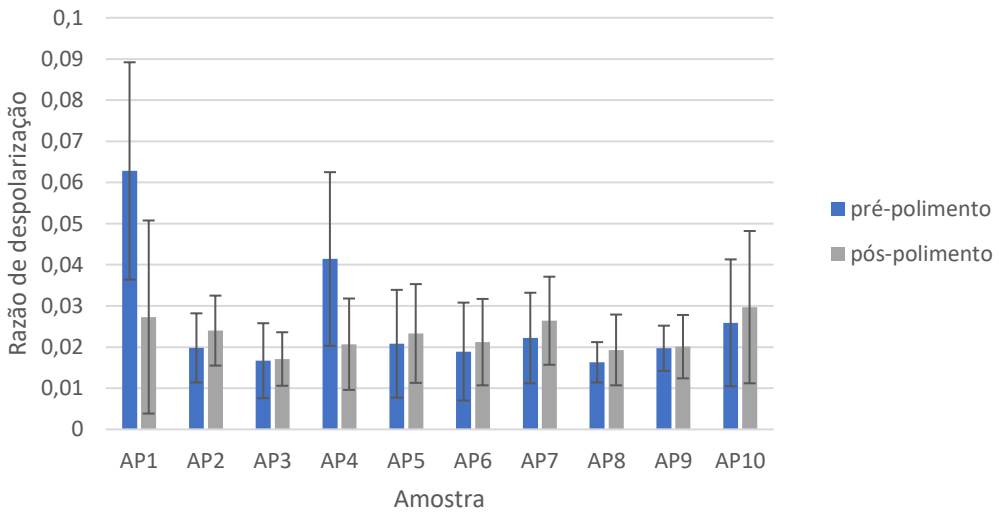

Figura 8.8-Resultados da razão de despolarização antes e após polimento para as amostras do Grupo AP.

Apesar de se ter verificado uma redução significativa do valor médio de ρ nas amostras AP1 e AP4, esta diminuição encontra-se dentro dos limites da incerteza (desvio padrão) das

medições realizadas. Nas restantes, não se registam alterações relevantes nos resultados da análise Raman antes e após polimento.

O polimento conduz à remoção da camada aprismática do esmalte, expondo a camada de esmalte prismática imediatamente abaixo. Enquanto no esmalte aprismático os cristais de HAp se encontram dispostos paralelamente entre si, no esmalte prismático distribuem-se de forma a formar prismas, em camadas com diferentes orientações [3]. Não se observado variações entre a razão de despolarização antes e após polimento, pode concluir-se que as diferenças a nível da estrutura e propriedades das duas camadas de esmalte não afetam a razão de despolarização.

As amostras AP1 e AP4 apresentavam razão de despolarização inicial superior às restantes amostras deste grupo, o que traduz uma perda prévia de estrutura cristalina. A redução do valor médio de ρ pode, assim, ser justificado pelo facto de o polimento ter permitido aceder a uma camada de esmalte intacta, não danificada por erosão externa.

Os resultados obtidos com a análise antes e após o branqueamento das amostras polidas e a respetiva incerteza encontram-se representados na figura 8.9.

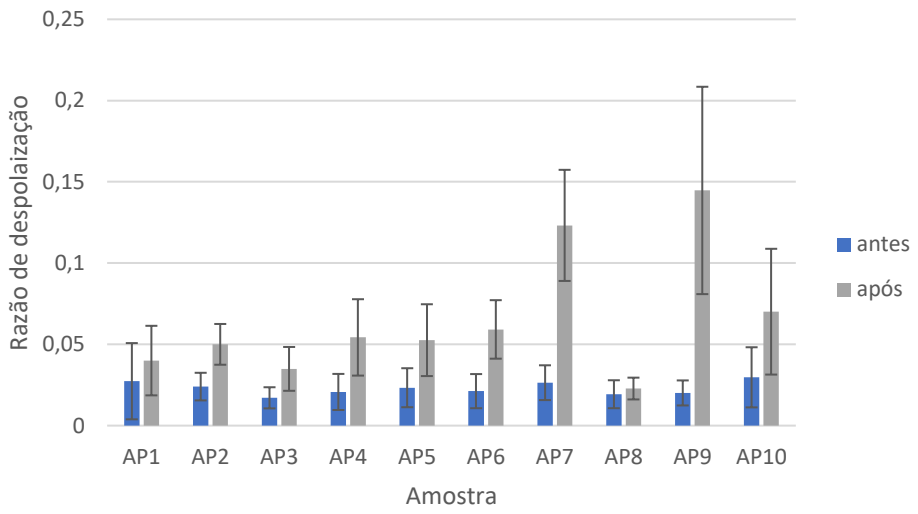

Figura 8.9-Resultados da razão de despolarização antes e após tratamento para as amostras do Grupo AP.

O valor médio da razão de despolarização foi de 0,02 ± 0,01 antes e 0,06 ± 0,05 após o branqueamento. Verificou-se um aumento do valor médio da razão de despolarização para todas as amostras. De salientar que a amostra com maior aumento da razão de despolarização, AP7, foi também a que verificou maior diminuição de dureza (70%). A amostra AP6, também com diminuição de dureza superior a 60%, apresenta igualmente um aumento inequívoco de razão de despolarização. Assim, os resultados parecem sugerir que a perda de estrutura cristalina da HAp, traduzida pelo aumento da razão de despolarização, pode estar correlacionada com diminuição de dureza do esmalte.

As diferenças dos resultados obtidos neste grupo face aos resultados verificados no grupo A, em que se utilizou o mesmo produto, sugerem que o polimento influencia as variações na

razão de despolarização antes e depois do branqueamento. A camada de esmalte exposta após este procedimento será, ao que tudo indica, mais suscetível à erosão causada pela ação dos peróxidos.

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste t-student e emparelhados com recurso ao software SPSS, considerando uma significância estatística para $p<0,05$. Obtiveram-se os seguintes resultados (Apêndice D):

- Observa-se diminuição da razão de despolarização para o grupo A, B e C ($p<0,001$);
- Não se observa alteração da razão de despolarização do grupo D ($p=0,279$);
- Observou-se aumento da razão de despolarização para o grupo AP ($p<0,001$).

Uma vez que, para esmalte saudável, não se espera emissão de radiação emitida com polarização perpendicular à da radiação incidente, a razão de polarização expectável será aproximadamente nula. Ionita [115] registou para esmalte são o valor de 0,05 para a razão de despolarização. Luís[106] registou valores médios de cerca de 0,06 para esmalte não tratado. Valores superiores podem ser indicativos da ocorrência da desmineralização prévia da amostra, não visível através da análise por lente estereoscópica realizada inicialmente. As diferenças verificadas na razão de despolarização inicial entre amostras podem ser justificadas pelo facto de as amostras provirem de diferentes tipos de dentes (caninos, incisivos, molares e pré-molares), pela variabilidade biológica intrínseca e por fatores como a idade, o género e perfil do indivíduo do qual foram extraídos.

Considerando globalmente as amostras não polidas, verifica-se que as alterações mais significativas da razão de despolarização se registaram para as amostras A10, B3 e C9, em que ocorreu diminuição do valor de ρ. Analogamente, com exceção de B6, todas as amostras com elevado valor de ρ inicial - A2, A5, B2, C10 -, verificaram uma tendência para a diminuição do valor médio de ρ. Todas estas amostras apresentavam ρ inicial muito superior à média, algumas com valores próximos dos registados por Ionita [115] para dentes careados (0,2). Este fator pode justificar as diferenças verificadas entre estas amostras e as que apresentavam um ρ inicial saudável, onde não se verificou uma alteração significativa da razão de despolarização.

Cavalli *et al*. [63] constataram que a inclusão de F em produtos branqueadores 10% PC, apicados 6 horas por dia durante 14 dias, reduziu a diminuição da intensidade dos picos associados aos modos vibracionais do fosfato, comparativamente a produtos sem o elemento. Também Bollineni *et al*., [116] avaliando por microscopia polarizada amostras de esmalte sujeitas a um produto branqueador com 10% PC com F, verificou remineralização em regiões com lesões de manchas brancas e menor profundidade de desmineralização relativamente a produtos não fluoretados. No presente estudo, observou-se igualmente uma tendência para a redução das manchas brancas correspondestes a lesões no esmalte, visíveis ao microscópio, nas medições de controlo nas amostras com elevado valor de razão de despolarização inicial.

Castro *et al*.[62] não verificaram indícios de desmineralização por espectroscopia Raman ao fim de 21 dias de utilização de um produto branqueador de 30% PC e pH=4, utilizado durante 30 minutos por dia. Godinho [117] verificou igualmente que a aplicação de um produto de ph=5,1 de 44% PC, uma vez por dia durante 30 minutos, não conduziu a alterações significativas da intensidade do pico do modo vibracional v_1 do fosfato após 7 dias de utilização. Cândido[107], efetuando medições da razão de despolarização do esmalte em profundidade em esmalte sujeito a bebidas ácidas de ph=2,43 durante seis ciclos de 1 minuto, seguidos de remineralização em saliva, verificou aumento da razão de despolarização, mas apenas até algumas dezenas de µm da superfície do dente. Assim, também não seriam esperados sinais de erosão com a utilização dos produtos de pH superior e concentração de agente ativo muito inferior usados neste estudo.

Santini *et al.*[60] verificaram redução da intensidade do pico fosfato por espectroscopia Raman com um regime de branqueamento em ambulatório de 10% PC, mas manteve as amostras conservados numa solução salina tamponizada entre sessões de branqueamento. Ora, o papel remineralizador da imersão em saliva não é desprezável: para além de contrabalançar o pH e fornecer iões para remineralização, os componentes orgânicos na sua constituição promovem a formação de uma película proteica superficial protetora [22][23]. Estas condições não são totalmente simuladas por soluções artificiais, razão pela qual parecem verificar-se mais indícios de desmineralização em estudos em que se não se utiliza saliva humana como remineralizador entre sessões de branqueamento [51].

Berger *et al.* [45] registaram desmineralização por espectroscopia FT-Raman de esmalte exposto a 10%, 30% e 50% de PH, aplicado durante 30 minutos. Contudo, foi realizado o polimento da superfície do esmalte. Considerando os resultados obtidos com as amostras do grupo experimental AP (amostras polidas), comparativamente ao grupo experimental A (amostras não polidas), parece verificar-se uma tendência para o esmalte polido ser mais suscetível ao aumento da razão de despolarização, uma vez que é eliminada parte do esmalte superficial e exposta uma matriz menos resistente ao branqueamento. Estes resultados sugerem que a inclusão do polimento no método experimental pode conduzir a resultados com pouca relevância clínica.

8.3.2 Fluorescência

Na maioria das amostras de todos os grupos, verificou-se uma clara diminuição da intensidade do sinal de fundo de fluorescência nos espectros da análise pós branqueamento, como indicado na figura 8.10.

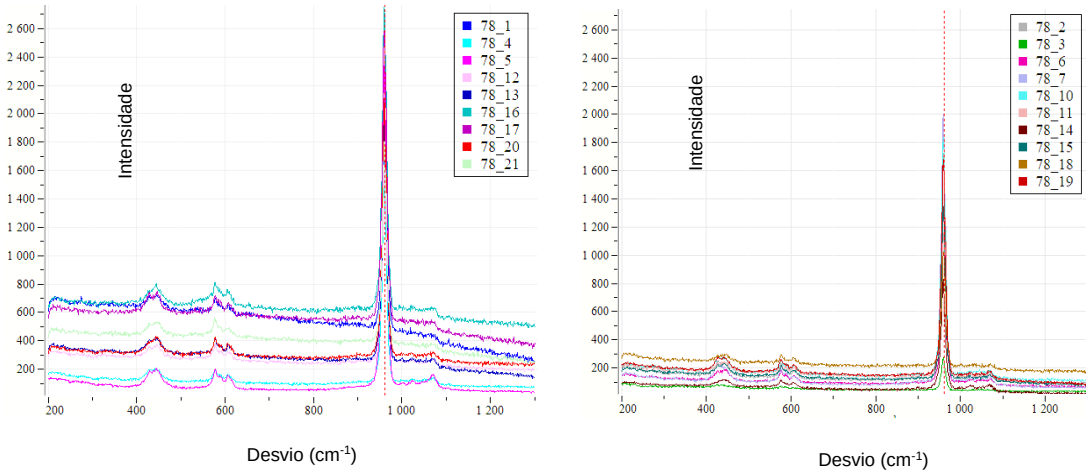

Figura 8.10-Comparação dos espectros obtidos com a análise pré (esquerda) e pós (direita) branqueamento para a amostra D6. Observa-se uma clara redução do sinal de fundo.

Um sinal de fundo intenso está associado à presença de átomos leves, como o carbono e o hidrogénio, na matriz analisada. Nestes, a energia do laser incidente é suficiente para despoletar uma transição eletrónica entre níveis de energia, conduzindo ao fenómeno de fluorescência Assim, a diminuição da intensidade do sinal de fundo de fluorescência aponta para a perda de matéria orgânica nas amostras medidas. Os resultados são coerentes com os observados por Silveira[35], após exposição do esmalte a produtos com elevadas concentrações de peróxido.

Sabendo que os pigmentos responsáveis pela pigmentação dentária são de natureza orgânica, a redução de fluorescência traduz a eficácia do branqueamento: os peróxidos atuaram sobre os compostos de carbono responsáveis pelo escurecimento decompondo-os em moléculas de cadeias mais curtas, passíveis de ser eliminados por difusão através da porosidade do esmalte. Este efeito é atestado pelo branqueamento evidente das amostras de todos os grupos experimentais. Por outro lado, não se descarta a hipótese de esta perda de matéria orgânica poder igualmente representar perdas a nível da composição proteica do esmalte, por efeito dos radicais livres.

8.4 Resultados do estudo por PIGE

A variação da concentração de flúor antes e após branqueamento foi avaliada através da razão entre o rendimento associado ao flúor relativamente ao rendimento associado ao fósforo (razão F/P). Assumindo que a concentração de fósforo se mantém constante antes e após branqueamento, é esperado um aumento da razão F/P nas amostras sujeitas a tratamento com produtos fluoretados e a manutenção do mesmo valor nos grupos sem F.

Os resultados obtidos para a razão F/P antes e após branqueamento com a respetiva incerteza são apresentados em seguida, para cada grupo. Devido à facilidade em visualizar o pico associado ao Na nos espectros de PIGE, foi igualmente calculada a razão entre o rendimento associado ao Na e ao P, exposta no apêndice C.

- Grupo A

A figura 8.11 apresenta os resultados da razão F/P antes e após branqueamento para o grupo A. Verifica-se um aumento significativo da razão F/P em todas as amostras, indicando incorporação de F no esmalte dentário. O valor médio antes do branqueamento foi de 0,2 ± 0,1 e após de 0,9 ± 0,5.

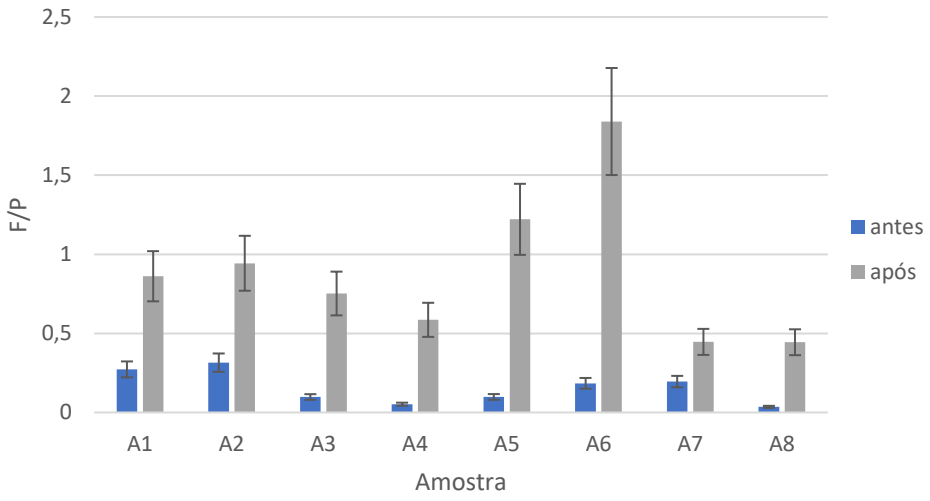

Figura 8.11-Resultados para a razão F/P e respetiva incerteza para as amostras do Grupo A.

- Grupo C

A figura 8.12 apresenta os resultados da razão F/P antes e após branqueamento para o grupo C. Com exceção da amostra C1, voltou a verificar-se um aumento significativo do rendimento associado a F relativamente a P para todas as amostras. O valor médio foi de 0,2 ± 0,1 antes do branqueamento e de 0,5 ± 0,2 após.

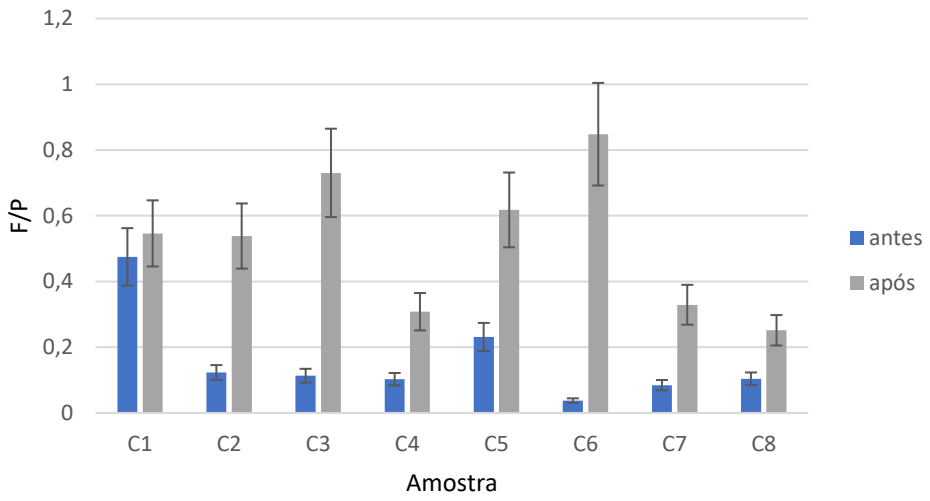

Figura 8.12-Resultados para a razão F/P e respetiva incerteza para as amostras do Grupo B.

- Grupo D

A figura 8.13 apresenta os resultados da razão F/P antes e após branqueamento para o grupo D. Este grupo de amostras foi sujeito a um produto sem F, tratando-se do controlo negativo. Como esperado, verificou-se manutenção da razão F/P, com exceção da amostra D4. O valor médio foi de 0,3 ± 0,2 antes e após o branqueamento.

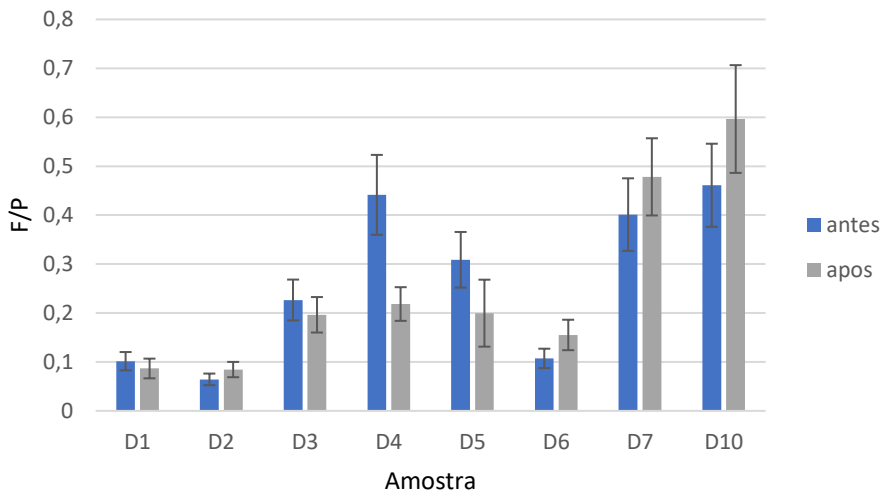

Figura 8.13-Resultados para a razão F/P e respetiva incerteza para as amostras do Grupo D.

- Grupo AP

A figura 8.14 apresenta os resultados da razão F/P antes e após branqueamento para o grupo E. Apesar do polimento, verificou-se aumento da razão F/P neste grupo, à semelhança do que ocorreu no grupo A. O valor médio foi de 0,09 ± 0,07 antes e 0,5 ± 0,08 após o branqueamento.

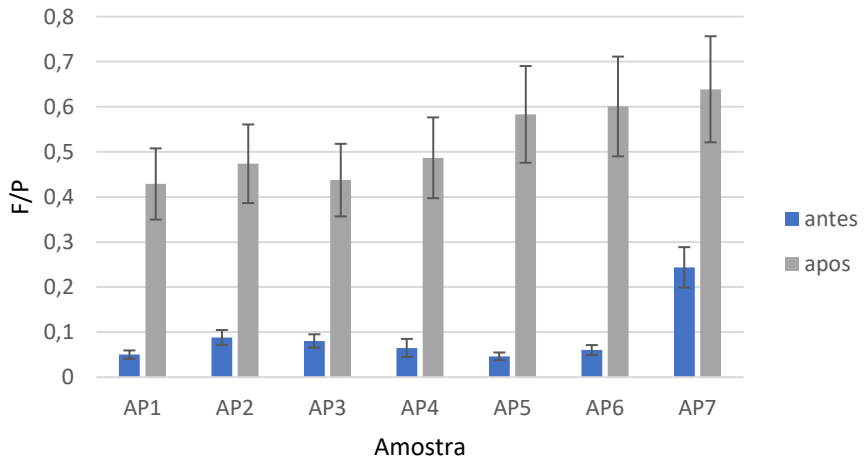

Figura 8.14-Resultados para a razão F/P e respetiva incerteza para as amostras do Grupo AP.

Uma análise global permite concluir que os produtos branqueadores contendo F conduzem, efetivamente, à incorporação de F pelo esmalte dentário. Contudo, os rendimentos

associados à reação não são proporcionais à sua concentração no esmalte: a concentração calculada a partir do rendimento tem em consideração a secção eficaz da reação e a estequiometria prevista para os elementos no esmalte. Assim, não é possível estimar uma variação percentual da concentração de F a partir da razão F/P. Apenas se pode verificar o aumento, diminuição ou manutenção da concentração do elemento relativamente à concentração de fósforo, que se supõe constante antes e após branqueamento.

Os resultados obtidos para a razão F/P foram analisados pelo teste *t-student* e emparelhados com recurso ao *software* SPSS, considerando uma significância estatística para $p<0,05$. Obtiveram-se os seguintes resultados (Apêndice E):

- Verificou-se um aumento estatisticamente significativo da razão F/P para os grupos A ($p=0,003$), C ($p=0,007$) e AP ($p<0,001$) quando comparados com o pré-tratamento;
- Não se observação alteração significativa da razão F/P para o grupo de controlo negativo D ($p= 0.807$).

De acordo com a literatura, os valores médios de F nos dentes não tratado têm variações bastante elevadas. A concentração deste elemento depende dos hábitos alimentares [75], da idade, [118] [119]da região de habitação do indivíduo[120] e da exposição a flúor ao longo da vida. Relativamente à idade, constata-se que existe uma maior concentração de F no esmalte com o aumento da idade do mesmo, uma vez que o esmalte vai absorvendo F ao longo dos anos quando exposta a alimentos ricos em F e à saliva [118] [119]. A exposição a água fluoretada é outro fator que condiciona a concentração do elemento no dente, verificando-se uma subida na quantidade de F tanto nos dentes com o aumento da percentagem de F na água consumida [120]. Além disso, os hábitos de higiene do indivíduo, nomeadamente a utilização recorrente de dentífricos fluoretados, é outro elemento a influenciar a concentração dentária de F [121]. Estes fatores, que não puderam ser aferidos neste trabalho, podem justificar as variações na razão F/P verificadas entre amostras, nas medições realizadas antes do branqueamento.

Além disso, a região e a face da qual foi extraída verificam igualmente diferenças em termos da concentração de flúor, para um mesmo indivíduo. Torrisi *et al*.[122] verificaram que a concentração de flúor era superior na face vestibular relativamente à palatina em incisivos e Gedalia *et al.* [118] verificaram maior concentração nas faces vestibulares e linguais/palatinas de molares relativamente às faces interproximais, devido ao aumento da área superficial exposta nestas faces ao elemento. Verifica-se também uma tendência para a concentração de F ser maior na zona oclusal em jovens e na zona cervical em idosos, devido à erosão da região oclusal ao longo dos anos [123]. No presente estudo, recorreu-se maioritariamente a faces vestibulares e não foi possível precisar a zona exata (oclusal, cervical ou medial) da incidência do feixe no dente, o que impossibilitou uma análise a este nível.

Relativamente ao tipo de dente, Gedalia *et al.* [118] constataram que existe uma maior concentração de F em caninos e incisivos relativamente a molares e pré-molares. Torrisi *et al.* [122] afirmaram que a concentração normal de F no esmalte é de 1500 ppm para incisivos e 800

ppm para molares na região mais superificial (~0,3 μm). Neste trabalho, contudo, não se verificaram diferenças evidentes entre a razão F/P verificada para molares e pré-molares (A1, C5, D7, E4 e E7) e as faces vestibulares de caninos e incisivos (restantes amostras) antes do branqueamento. Este facto pode também estar relacionado coma elevada profundidade a que foi realizada a medição, uma vez que se regista um *plateau* para a concentração de F para profundidades superiores a 100 μm.[123] A esta profundidade, as diferenças entre tipos de dentes podem tornam-se menos evidentes. Além disso, as amostras provinham de diferentes indivíduos, e parecem verificar-se que as diferenças de concentração de F estão mais relacionadas com a idade da amostra do que pelo tipo de dente [118].

É importante ainda ter em conta que a análise por PIGE avalia a incorporação de F numa área pontual (2 mm x 2 mm) localizada a cerca de 150 μm de profundidade no esmalte. Torrisi *et al.* [122] verificou que a maior concentração se encontra nos primeiros nanómetros da superfície do esmalte, diminuindo gradualmente em profundidade. Weatherell *et al*. [124] verificaram que o F se concentra maioritariamente nos primeiros 10-20 μm e Brudevold *et al*. [119] registaram concentrações de F nas primeiras camadas de esmalte até 10 vezes superiores ao valor médio registado na literatura para o esmalte inteiro. Assim, numa região mais superficial, seria expectável uma maior razão F/P, e os resultados apresentados não podem ser interpretados como um valor global da concentração relativa de F na amostra.

Por outro lado, Funato *et al*. [73] constatou, pela técnica de PIGE, que a concentração de F em esmalte tratado com materiais restauradores parece variar até cerca de 118 μm, diminuindo sucessivamente até atingir um valor constante. Pai *et al*.[125] registou absorção de F por tratamento com produtos de aplicação local de F e pastas dentífricas até uma profundidade de 50 μm. Holler et al.[121] quantificou a absorção de F de esmalte exposto a quatro soluções fluoretadas remineralizadoras de 1600 ppm, registando absorção de F apenas até 140 μm após aplicação prolongada. Tendo a medição de F no presente estudo sido realizada a cerca de 150 μm de profundidade, pode concluir-se que a absorção de F do esmalte sujeito a branqueadores atinge uma profundidade superior à registada para dentífricos, soluções fluoretadas e materiais restauradores. Este fator pode estar relacionado com o facto de o elemento ser disperso por difusão pelos poros do esmalte com os peróxidos.

O aumento entre o valor da razão F/P antes e após branqueamento foi de 0,7 ± 0,5 com o produto Opalescence PF (grupo A) e de 0,3 ± 0,3 como produto Opalescence Go (Grupo C). Assim, pode concluir-se que a assimilação de F foi superior com o produto A, relativamente ao C. Esta diferença pode estar relacionada com o agente ativo de cada branqueador: peróxido de carbamida no produto A e peróxido de hidrogénio no produto C. O PC decompõe-se mais lentamente no esmalte e o tempo de aplicação era também muito superior (14h) ao do produto de PH (90 minutos). Este fator pode ter permitido garantir uma maior difusão ao longo do esmalte e uma distribuição mais abrangente do F ao longo da amostra, sobretudo em profundidade.

Relativamente ao aumento de F/P registado, verifica-se que esta não é uniforme nos grupos sujeitos a produtos branqueadores fluoretados, variando bastante entre amostras. Estas

diferenças não parecem estar relacionadas com o valor inicial da razão F/P, tipo de dente ou com as condições experimentais, uma vez que todas as amostras foram sujeitas aos mesmos procedimentos. Também Luís[106], que estudou os efeitos no esmalte de dois estimulantes gustativos salivares por PIGE, verificou que, no produto em que se verificou incorporação de F, o aumento da concentração oscilou entre 40 e 185%. Analogamente, Holler *et al*.[121] verificaram diferenças significativas na incorporação de F entre amostras sujeitas a soluções fluoretadas com a mesma concentração de F e pH semelhante. Estas variações não têm uma causa evidente e são atribuídas à variabilidade biológica intrínseca da amostra.

Comparando o grupo A com o grupo AP, verifica-se uma maior razão F/P nas medições pré-branqueamento nas amostras do primeiro grupo (0,09 ± 0,07) relativamente ao segundo (0,2 ± 0,1). Estes resultados são expectáveis, uma vez que a remoção da camada superficial de esmalte com o polimento no grupo E permite ao feixe de partículas atingir uma região mais profunda do esmalte, onde é esperada uma menor concentração de F. Verifica-se também uma diferença de 0,4 ± 0,08 entre a razão F/P antes e depois do branqueamento no grupo AP, bastante inferior à registada no grupo A. Estes resultados sugerem que a capacidade de assimulação de F diminui nas camadas mais internas do esmalte. Além disso, o F incorporado nestas amostras não foi suficiente para evitar o aumento da razão de despolarização e a perda de dureza verificada neste grupo.

No grupo de controlo negativo, verificou-se uma diminuição significativa de F na amostra D4 e uma redução ligeira na amostra D5, o que não se verifica para nenhum outro grupo. Repetiu-se a análise da amostra D4 posteriormente, tendo-se obtido sempre baixas concentrações de F relativamente a P. O branqueador não fluoretado poderá, por isso, ter potencial para conduzir à perda de F no esmalte. Burgmaier *et al*.[126] verificou igualmente perda de F como consequência do branqueamento, que não foi reposta com tratamentos de fluoretação posteriores. Assim, a inclusão de F no produto de branqueador pode não contribuir para aumentar o valor basal de F no dente, como também evitar a sua diminuição.

A região de pH de maior interesse para a incorporação de flúor no esmalte corresponde ao intervalo entre 4,5 e 5,5, correspondente aos valores em que a HAp desmineraliza e a FAp está em condições para mineralizar [8]. A pH neutro, a absorção de F dá-se maioritariamente devido às diferenças de carga entre F^- e a hidroxiapatite, que apresenta tendência para manter carga positiva devido à acumulação de iões de cálcio [73]. Apesar de o pH neutro evitar a erosão dentária, é provável que o pH próximo de 7 destes produtos tenha limitado a assimilação de F pelo esmalte. Friberger [127] estudou a absorção de F usando dentífricos de fluoreto de sódio e de nitrato de potássio com pH que variava entre 7,1 e 4,5, verificando que a assimilação de F era 5 vezes maior quando utilizada a solução de menor pH, relativamente à de pH neutro. Assim, também neste contexto, seria relevante estudar o efeito do pH do produto na incorporação de F pelo esmalte.

Adicionalmente, verificou-se o aumento da concentração de Na em algumas amostras dos vários grupos (apêndice F), o que pode estar relacionado coma presença de NaF nos produtos

aplicados aos grupos A, C e E e hidróxido de sódio no produto aplicado ao grupo D, bem como pela presença do elemento na saliva na qual se mantiveram as amostras entre aplicações do branqueador.

8.5 Análise global

Considerando os resultados globalmente, pode deduzir-se que se deu um processo de remineralização por parte dos branqueadores contendo fluor que conduziram à incorporação de F. Sabe-se que o flúor promove a remineralização do esmalte: a presença de F irá tornar a saliva supersaturada relativamente à FHAp, conduzindo a que o elemento seja adsorvido à superfície dos cristais parcialmente desmineralizados e atraia mais iões de cálcio [32]. Este efeito pode ter sido responsável pela redução da razão de despolarização verificada nos grupos A e C.

Contudo, a ocorrência de remineralização no grupo B, não sujeito a F, sugere que pode não ter sido a inclusão deste elemento no branqueador a causa da diminuição da razão de despolarização, podendo existir outro componente no branqueador a contribuir para o efeito. O xilitol presente neste produto tem potencial para induzir a morte celular em bactérias presentes na placa bacteriana responsáveis pelo aumento da acidez e de diminuir a adesão de destas ao esmalte, podendo ter desempenhado um papel protetor [128]. Pode ainda colocar-se a hipótese de a saliva, atuando durante duas semanas sobre as amostras, ter contribuído para restabelecer a razão de despolarização das amostras com sinais prévios de danificação até valores mais próximos do esperado para o esmalte são.

Por outro lado, a não ocorrência de remineralização para o grupo D, igualmente sem F, pode estar relacionado com o facto de pH medido para o produto aplicado neste grupo ser mais baixo (5,8) ou por este grupo possuir menos amostras com indícios de desmineralização prévia (ρ elevado), que são as únicas onde se verifica a tendência para diminuição da razão de despolarização. Os espécimes com maior perda de dureza são os mesmo que apresentam o maior aumento a nível da razão de despolarização, sugerindo que os dois fenómenos estão relacionados.

A exceção ao fenómeno de remineralização verificado corresponde ao grupo polido, em que a remoção da camada de esmalte aprismático terá tornado o esmalte mais suscetível à erosão. A ocorrência de um aumento significativo da razão de despolarização no grupo AP e da sua redução no grupo A, estando ambos expostos ao mesmo produto, sugere que as propriedades físicas do esmalte superficial e sub-superificial são significativamente diferentes. Ainda neste grupo, os resultados do teste de Vickers indicam que a adição de 0,11% de F no produto branqueador não preveniu a perda de dureza, A análise por PIGE revelou que a assimilação relativa de F foi inferior ao verificado no grupo não polido sujeito ao mesmo produto, o que pode justificar a ineficácia do efeito protetor do elemento nestas amostras. À luz destes resultados, é pertinente colocar em causa a relevância clínica dos testes aplicados a amostras de esmalte polido.

Assim, pode concluir-se que os produtos branqueadores em estudo são seguros e não provocam a desmineralização do esmalte hígido, mas não que tenha sido o flúor o responsável pelo fenómeno de remineralização. Por outro lado, a ausência de registo de desmineralização não invalida que a suscetibilidade a cáries tenha aumentado: o branqueamento conduz ao aumento do diâmetro dos poros e da aderência do esmalte, o que pode levar ao aumento da sua permeabilidade a bactérias cariogénicas e a uma progressão mais rápida de lesões de cáries [129]. Neste caso, os produtos fluoretados podem desempenhar um papel importante relativamente aos produtos sem F, protegendo o esmalte de ataques bacterianos posteriores; seria necessário realizar estudos de exposição a ataques cariogénicos para avaliar cabalmente o potencial protetor do flúor.

9. Conclusões

O presente estudo permitiu concluir que nenhum dos produtos, com ou sem F, conduziu à desmineralização do esmalte hígido. Os produtos Opalescence PF 16% PC, Opalescence Go 6% PH e Paint On Plus conduziram à remineralização do esmalte com sinais prévios de perda de estrutura cristalina, enquanto que o produto Vivastyle não alterou o estado de mineralização do esmalte. O polimento do esmalte aumentou a suscetibilidade do dente à desmineralização, manifestada pelo aumento da razão de despolarização no grupo AP. Todos os produtos conduziram à diminuição da fluorescência nos espectros de espectroscopia Raman, indicando perda de matéria orgânica.

A adição de F ao produto branqueador conduziu, efetivamente, à incorporação do mesmo pelo esmalte, sendo que a assimilação de F foi superior no produto Opalescence PF 16% PC relativamente ao produto Opalescence Go 6% PH. Não houve variação da concentração relativa de F após aplicação do produto Vivastyle 16% PC (controlo negativo). A análise por PIGE do grupo de amostras polidas permitiu ainda concluir que a percentagem de F e capacidade de incorporação do mesmo diminuem em profundidade no esmalte.

O processo de polimento do esmalte revelou-se essencial à aplicação do teste de microdureza de Vickers. O produto Opalescence PF 16% PC conduziu à perda de dureza do esmalte polido, parecendo existir uma correlação entre a perda significativa de dureza o aumento da razão de despolarização. Contudo, as diferenças observadas entre esmalte polido e não polido expostas ao mesmo produto branqueador conduziram ao questionamento da relevância clínica dos resultados obtidos com técnicas que exigem o polimento da superfície do dente.

A razão entre as intensidades dos picos Rayleigh/Compton medidos por EDXRF não é suficientemente sensível para estimar o Z_{ef} do esmalte, por razões que se prendem com a geometria da amostra. O recurso a EDXRF por micro-feixe poderia conduzir a resultados mais conclusivos.

10. Perspetivas futuras

Em termos de estudos a realizar futuramente para obter uma maior compreensão dos fenómenos e causa e melhor enquadrar os resultados no contexto clínico, sugere-se:

- Realizar estudos com produtos de maior concentração de peróxido ou menor pH, de forma a verificar um grau de desmineralização significativo, passível de ser minorada pela inclusão de flúor.
- Verificar o efeito de produtos com o mesmo pH mas concentrações de peróxido diferentes, de forma a averiguar o papel destes parâmetros na erosão.
- Verificar o efeito do aumento da concentração de flúor ou da utilização de outros compostos fluoretados nos branqueadores, como o APF.
- Averiguar as diferenças entre a aplicação de flúor durante e após o tratamento e o efeito da adição de outros produtos remineralizadores, como ACP, na composição do produto.
- Realizar um estudo comparativo do efeito da remineralização por saliva humana, relativamente a saliva artificial ou um controlo.
- Renovar mais frequentemente a saliva durante o estudo e a realização de estudos adicionais *in vivo*, para aumentar a relevância clínica dos resultados.
- Realizar uma análise em profundidade da concentração de flúor por PIGE e da razão de despolarização por Raman nos casos em que se verifique desmineralização a nível superficial.
- Recorrer a um espectrómetro confocal de EDXRF nas medições da razão Rayleigh/Compton e combinar esta análise com a o estudo da concentração dos elementos *major* (Ca e P) e *minor* (Fe, Cu, Zn, Pb e Sr) do dente.
- Aplicar o teste de microdureza a produtos com a mesma percentagem de agente ativo com e sem F, à semelhança do que foi realizado com as restantes técnicas.
- Verificar o efeito remineralizador da saliva após o branqueamento na dureza e razão de despolarização do esmalte.
- Obter informação relativamente à idade, região de origem e perfil dos indivíduos dos quais provieram os dentes.
- Estudar a suscetibilidade do esmalte a ataques cariogénicos e à desmineralização por diferentes agentes, com estudos que tenham em consideração a exposição das amostras a ácidos e a atividades abrasivas depois do braqueamento.
- Conjugar as técnicas microscopia eletrónica de varrimento ou técnica microscopia de força atómica para estudos das alterações da micromorfologia do esmalte.

11. Divulgação

S. Silva, J. M. Silveira, M. Fonseca, A. Amaral, H. Silva, A. Jesus, A. Mata, M. L. Carvalho, S. Pessanha, *Effects on bleaching products containing fluoride on tooth enamel,* poster apresentado no *3rd Nova Biomedical Engineering Workshop*, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Almada, 9 de Maio 2018

S. Pessanha, S. Silva, L. Martins, M. L. Carvalho, *Taking advantage of Compton-to-Rayleigh ratio in EDXRF spectra to recognize hydroxyapatite-based materials*, abstract submetido na conferência *European Conference on X-Ray Spectrometry*, Jubljana, Eslovénia, 24-29 Junho 2018, disponível em: https://exrs2018.ijs.si/abs/exrs2018-book.pdf

S. Silva, J. M. Silveira, M. Fonseca, A. Amaral, H. Silva, A. Jesus, A. Mata, M. L. Carvalho, S. Pessanha, *Effects of bleaching products containing fluoride on tooth enamel: application of polarized Raman spectroscopy*, *abstract* submetido no *European Congress on Molecular Spectroscopy*, Coimbra, 19-24 Agosto 2018, disponível em: http://www.qui.uc.pt/eucmos2018/Abstracts_book_EUCMOS2018.pdf

S. Silva, J. M. Silveira, S. Pessanha, M. Fonseca, D. Marques, A. Mata, Incorporação de flúor no esmalte durante o branqueamento dentário, *abstract* submetido no XXXVIII Congresso Anual da Sociedade Portuguesa de Estomatologia e Medicina Dentária, Lisboa, 12-13 Outubro 2018

S. Pessanha, S. Silva, J.M. Silveira, M. L. Carvalho, *Suitability of X Ray Fluorescence for the recognition of hydroxyapatite-based materials*, *abstract* submetido na Conferência Latino-americana de Análise por Técnicas de Raios X (SARX), Araucanía, Chile, 4-7 Novembro 2018

S. Pessanha, S. Silva, J. M. Silveira, L. Martins, M. L. Carvalho, *Taking advantage of Compton-to-Rayleigh ratio in X ray Fluorescence spectra to recognize hydroxyapatite-based materials*, submetido para *Journal of Analytical and Atomic Spectroscopy*

Bibliografia

[1] N. Fernandes, “Branqueamento Dentário: princípios ativos e perpetiva farmacológica,” Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, 2013.

[2] L. C. N. da Mota, “Branqueamento de dentes vitais: perspectiva quanto à eficiência química, eficácia clínica e segurança do paciente,” Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, 2011.

[3] B. K. B. Berkovitz, G. R. Holland, and B. J. Moxham, *Oral Anatomy, Histology and Embryology*, 4th ed. Mosby Elsevier, 2009.

[4] J. P. G. Ferra, “Branqueamento de dentes vitais em consultório,” Universidade Fernando Pessoa-Faculdade Ciências da Saúde, 2010.

[5] S. Ferreira, “Perspectiva dos Médicos Dentistas acerca da metodologia clínica aplicada nos tratamentos de Branqueamento Dentário,” Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, 2009.

[6] M. Alqahtani, “Tooth-bleaching procedures and their controversial effects: A literature review,” *Saudi Dent. J.*, vol. 26, no. 2, pp. 33–46, Apr. 2014.

[7] L. Sun *et al.*, “Surface alteration of human tooth enamel subjected to acidic and neutral 30% hydrogen peroxide,” *J. Dent.*, vol. 39, no. 10, pp. 686–692, Oct. 2011.

[8] J. M. ten Cate, “Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride,” *Acta Odontol. Scand.*, vol. 57, no. 6, pp. 325–329, Jan. 1999.

[9] “Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica | Faculdade de Ciências e Tecnologia / Universidade Nova de Lisboa.” [Online]. Available: https://www.fct.unl.pt/ensino/curso/mestrado-integrado-em-engenharia-biomedica. [Accessed: 30-Dec-2017].

[10] “What Is the Critical pH and Why Does a Tooth Dissolve in Acid?,” *J. Can. Dent. Assoc. (Tor).*, vol. 722, no. 11, 2003.

[11] R. R. Seeley, T. D. Stephens, and F. Tate, *Anatomy & Physiology*, 9th ed. New-York: McGraw-Hill, 2016.

[12] A. Naci, *Ten Cate’s Oral Histology:Development, Structure and Function*, 8th ed. Mosby Elsevier, 2012.

[13] T. Buchwald, Z. Okulus, and M. Szybowicz, “Raman spectroscopy as a tool of early dental caries detection–new insights,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 48, no. 8, pp. 1094–1102, 2017.

[14] C. E. Goldstein, R. E. Goldstein, R. A. Feinman, and D. A. Garber, “Bleaching vital teeth: state of the art.,” *Quintessence Int.*, vol. 20, no. 10, pp. 729–37, Oct. 1989.

[15] A. Ben-Amar, R. Liberman, C. Gorfil, and Y. Bernstein, “Effect of mouthguard bleaching on enamel surface.,” *Am. J. Dent.*, vol. 8, no. 1, pp. 29–32, Feb. 1995.

[16] X. Wang, “Structural aspects of bleaching and fluoride application on dental enamel,” Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg, 2008.

[17] L. W. Ripa, A. J. Gwinnett, and M. G. Buonocore, “The ‘prismless’ outer layer of deciduous and permanent enamel,” *Arch. Oral Biol.*, vol. 11, no. 1, pp. 41-IN5, Jan. 1966.

[18] T. Kodaka, F. Nakajima, and S. Higashi, “Structure of the So-Called ‘Prismless’ Enamel in Human Deciduous Teeth,” *Caries Res.*, vol. 23, no. 5, pp. 290–296, 1989.

[19] C. D. Lynch, V. R. O’Sullivan, P. Dockery, C. T. McGillycuddy, and A. J. Sloan, “Hunter-Schreger Band patterns in human tooth enamel,” *J. Anat.*, p. no-no, Jun. 2010.

[20] S. Isaac, F. Brudevold, F. A. Smith, and D. E. Gardner, “Solubility Rate and Natural Fluoride Content of Surface and Subsurface Enamel,” *J. Dent. Res.*, vol. 37, no. 2, pp. 254–263, Apr. 1958.

[21] J. S. Wefel and J. D. Harless, “The Effect of Topical Fluoride Agents on Fluoride Uptake

and Surface Morphology," *J. Dent. Res.*, vol. 60, no. 11, pp. 1842–1848, Nov. 1981.

[22] Y. Sa *et al.*, "Effects of Two In-Office Bleaching Agents with Different pH on the Structure of Human Enamel: An *In Situ* and *In Vitro* Study," *Oper. Dent.*, vol. 38, no. 1, pp. 100–110, Jan. 2013.

[23] M. Hannig and M. Balz, "Influence of in vivo Formed Salivary Pellicle on Enamel Erosion," *Caries Res.*, vol. 33, no. 5, pp. 372–379, 1999.

[24] H. G. McCann, "The solubility of fluorapatite and its relationship to that of calcium fluoride," *Arch. Oral Biol.*, vol. 13, no. 8, pp. 987–1001, Aug. 1968.

[25] E. A. Abou Neel *et al.*, "Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone.," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 11, pp. 4743–4763, 2016.

[26] G. Hemagaran and P. Neelakantan, "Remineralization of the Tooth Structure -The Future of Dentistry," *Int. J. PharmTech Res.*, vol. 6, no. 2, pp. 487–493.

[27] J. M. Cate, "Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention," *Eur. J. Oral Sci.*, vol. 105, no. 5, pp. 461–465, Oct. 1997.

[28] E. C. Reynolds *et al.*, "Fluoride and Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate," *J. Dent. Res.*, vol. 87, no. 4, pp. 344–348, Apr. 2008.

[29] O. Fejerskov, A. Thylstrup, and M. J. Larsen, "Rational Use of Fluorides in Caries Prevention," *Acta Odontol. Scand.*, vol. 39, no. 4, pp. 241–249, Jan. 1981.

[30] M. J. Larsen and S. J. Jensen, "On the Properties of Fluoride Solutions Used for Topical Treatment and Mouth Rinse," *Caries Res.*, vol. 20, no. 1, pp. 56–64, 1986.

[31] T. Attin, B. Dumont, and W. Buchalla, "Fluoride uptake in caries, eroded and sound enamel after application of a 2000 ppm fluoride solution," *Dtsch Zahnärztl Z*, vol. 55, pp. 455–460, 2000.

[32] M. A. R. Buzalaf, J. P. Pessan, H. M. Honório, and J. M. ten Cate, "Mechanisms of Action of Fluoride for Caries Control," in *Monographs in oral science*, vol. 22, 2011, pp. 97–114.

[33] J. Castro, "Estudo dos efeitos do abuso de produtos de branqueamento no esmalte dentário," Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2015.

[34] L. Greenwall, *Tooth Whitening Techniques*, 2nd ed. London: CRC Press, 2017.

[35] J. Silveira, "Efeitos do peróxido de hidrogénio nos tecidos dentários," Faculdade de Medicina Dentária, Universidade Nova de Lisboa, 2015.

[36] S. Ferreira, "Perspectiva dos Médicos Dentistas acerca da metodologia clínica aplicada nos tratamentos de Branqueamento Dentário Universidade," Faculdade de Ciências da Saúde, Universade Fernando Pessoa, 2009.

[37] S. A. Nathoo, "The chemistry and mechanisms of extrinsic and intrinsic discoloration," *J. Am. Dent. Assoc.*, vol. 128, p. 6S–10S, Apr. 1997.

[38] V. B. Haywood, "History, safety, and effectiveness of current bleaching techniques and applications of the nightguard vital bleaching technique.," *Quintessence Int.*, vol. 23, no. 7, pp. 471–88, Jul. 1992.

[39] V. B. Haywood, "Treating sensitivity during tooth whitening.," *Compend. Contin. Educ. Dent.*, vol. 26, no. 9 Suppl 3, pp. 11–20, Sep. 2005.

[40] K. Fischer, *VivaStyle scientific documentation*, vol. 1, no. 1. Liechtenstein: Ivoclar Vivadent, 2013.

[41] K. H. Lee, H. I. Kim, K. H. Kim, and Y. H. Kwon, "Mineral loss from bovine enamel by a 30% hydrogen peroxide solution," *J. Oral Rehabil.*, vol. 33, no. 3, pp. 229–233, Mar. 2006.

[42] N. Efeoglu, D. Wood, and C. Efeoglu, "Microcomputerised tomography evaluation of 10% carbamide peroxide applied to enamel," *J. Dent.*, vol. 33, no. 7, pp. 561–567, Aug. 2005.

[43] R. R. Seghi and I. Denry, "Effects of External Bleaching on Indentation and Abrasion Characteristics of Human Enamel in vitro," *J. Dent. Res.*, vol. 71, no. 6, pp. 1340–1344, Jun. 1992.

[44] S. S. Azer, C. Machado, E. Sanchez, and R. Rashid, “Effect of home bleaching systems on enamel nanohardness and elastic modulus,” *J. Dent.*, vol. 37, no. 3, pp. 185–190, Mar. 2009.

[45] A. de Arruda, P. dos Santos, R. Sundfeld, S. Berger, and A. Briso, “Effect of Hydrogen Peroxide at 35% on the Morphology of Enamel and Interference in the De-remineralization Process: An *In Situ* Study,” *Oper. Dent.*, vol. 37, no. 5, pp. 518–525, Sep. 2012.

[46] T. Bistey, I. P. Nagy, A. Simó, and C. Hegedűs, “In vitro FT-IR study of the effects of hydrogen peroxide on superficial tooth enamel,” *J. Dent.*, vol. 35, no. 4, pp. 325–330, Apr. 2007.

[47] R. Basting, “Peróxido de Carbamida: Efeitos na micromorfologia e rugoridade das estruturas dentais.,” vol. 41, no. 1, pp. 1–104, 2005.

[48] M. Sulieman, M. Addy, E. Macdonald, and J. S. Rees, “A safety study in vitro for the effects of an in-office bleaching system on the integrity of enamel and dentine,” *J. Dent.*, vol. 32, no. 7, pp. 581–590, Sep. 2004.

[49] T. Abouassi, M. Wolkewitz, and P. Hahn, “Effect of carbamide peroxide and hydrogen peroxide on enamel surface: an in vitro study,” *Clin. Oral Investig.*, vol. 15, no. 5, pp. 673–680, Oct. 2011.

[50] L. Po and N. Wilson, “Effects of different desensitizing agents on bleaching treatments,” *Eur. J. Gen. Dent.*, vol. 3, no. 2, p. 93, 2014.

[51] T. Attin, P. R. Schmidlin, F. Wegehaupt, and A. Wiegand, “Influence of study design on the impact of bleaching agents on dental enamel microhardness: A review,” *Dent. Mater.*, vol. 25, no. 2, pp. 143–157, Feb. 2009.

[52] J. B. Costa and R. F. Mazur, “Effects of New Formulas of Bleaching Gel and Fluoride Application on Enamel Microhardness: An *In Vitro* Study,” *Oper. Dent.*, vol. 32, no. 6, pp. 589–594, Nov. 2007.

[53] L. George, A. Baby, T. P. Dhanapal, K. M. Charlie, A. Joseph, and A. A. Varghese, “Evaluation and comparison of the microhardness of enamel after bleaching with fluoride free and fluoride containing carbamide peroxide bleaching agents and post bleaching anticay application: An in vitro study.,” *Contemp. Clin. Dent.*, vol. 6, no. 1, pp. 163–166, Sep. 2015.

[54] A. B. Borges, L. Y. Samezima, L. P. Fonseca, K. C. K. Yui, A. L. S. Borges, and C. R. G. Torres, “Influence of Potentially Remineralizing Agents on Bleached Enamel Microhardness,” *Oper. Dent.*, vol. 34, no. 5, pp. 593–597, Sep. 2009.

[55] R. de Oliveira, A. F. Paes Leme, and M. Giannini, “Effect of a carbamide peroxide bleaching gel containing calcium or fluoride on human enamel surface microhardness,” *Braz. Dent. J.*, vol. 16, no. 2, pp. 103–106, Aug. 2005.

[56] T. Attin, M. Kocabiyik, W. Buchalla, C. Hannig, and K. Becker, “Susceptibility of enamel surfaces to demineralization after application of fluoridated carbamide peroxide gels,” *Caries Res.*, vol. 37, no. 2, pp. 93–99, 2003.

[57] W. C. Nascimento, Y. do S. B. de L. Gomes, L. D. Alexandrino, H. T. Costi, J. O. C. Silva, and C. M. Silva, “Influence of fluoride concentration and pH Value of 35% hydrogen peroxide on the hardness, roughness and morphology of bovine enamel.,” *J. Contemp. Dent. Pract.*, vol. 15, no. 4, pp. 392–8, Jul. 2014.

[58] I. Lewinstein, N. Fuhrer, N. Churaru, and H. Cardash, “Effect of different peroxide bleaching regimens and subsequent fluoridation on the hardness of human enamel and dentin,” *J. Prosthet. Dent.*, vol. 92, no. 4, pp. 337–342, 2004.

[59] A. C.-T. Ko, L.-P. Choo-Smith, M. Hewko, M. G. Sowa, C. C. S. Dong, and B. Cleghorn, “Detection of early dental caries using polarized Raman spectroscopy.,” *Opt. Express*, vol. 14, no. 1, pp. 203–215, 2006.

[60] A. Santini, C. R. Pulham, A. Rajab, and R. Ibbetson, “The effect of a 10% carbamide peroxide bleaching agent on the phosphate concentration of tooth enamel assessed by Raman spectroscopy,” *Dent. Traumatol.*, vol. 24, no. 2, pp. 220–223, Apr. 2008.

[61] S. B. Berger *et al.*, “Effects of various hydrogen peroxide bleaching concentrations and number of applications on enamel,” *Brazilian J. Oral Sci.*, vol. 13, no. 1, pp. 22–27, Mar. 2014.

[62] J. Castro, J. Godinho, A. Mata, J. M. Silveira, and S. Pessanha, “Study of the effects of unsupervised over-the counter whitening products on dental enamel using u-Raman and u-EDXRF spectroscopies,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 47, no. 4, pp. 444–448, 2016.

[63] V. Cavalli *et al.*, “Effects of the Addition of Fluoride and Calcium to Low-Concentrated Carbamide Peroxide Agents on the Enamel Surface and Subsurface,” *Photomed. Laser Surg.*, vol. 29, no. 5, pp. 319–325, May 2011.

[64] J. Godinho, J. Silveira, A. Mata, M. L. Carvalho, and S. Pessanha, “Effect of bleaching gel in Ca, P and Zn content in tooth enamel evaluated by micro-EDXRF,” *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*, vol. 337, pp. 78–82, 2014.

[65] J. Silveira, J. Godinho, A. Mata, M. L. Carvalho, and S. Pessanha, “Assessment of teeth elemental content using μ-EDXRF: Effects by in-office and at-home bleaching products,” *X-Ray Spectrom.*, vol. 44, no. 1, pp. 3–6, 2015.

[66] M. Sorozini, R. S. Dos Santos, E. M. Silva, M. J. Dos Anjos, and C. R. Perez, “Assessment of Ca and P content variation in enamel during an eight-week bleaching protocol using energy dispersive X-ray fluorescence,” *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 131, pp. 93–98, May 2017.

[67] A. C. B. De Carvalho Filho, R. P. Sanches, A. A. Martin, A. M. Do Espírito Santo, and L. E. S. Soares, “Energy dispersive X-ray spectrometry study of the protective effects of fluoride varnish and gel on enamel erosion,” *Microsc. Res. Tech.*, vol. 74, no. 9, pp. 839–844, 2011.

[68] S. A. Kerr, K. Kouris, C. E. Webber, and T. J. Kennett, “Coherent scattering and the assessment of mineral concentration in trabecular bone.,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 25, no. 6, pp. 1037–47, Nov. 1980.

[69] P. Puumalainen, H. Olkkonen, and P. Sikanen, “Assessment of fat content of liver by a photon scattering technique,” *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, vol. 28, no. 9, pp. 785–787, Sep. 1977.

[70] P. Duvauchelle, G. Peix, and D. Babot, “Effective atomic number in the Rayleigh to Compton scattering ratio,” *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*, vol. 155, no. 3, pp. 221–228, Aug. 1999.

[71] V. D. Hodoroaba and V. Rackwitz, “Gaining improved chemical composition by exploitation of compton-to-rayleigh intensity ratio in XRF analysis,” *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 14, pp. 6858–6864, 2014.

[72] H. Komatsu *et al.*, “Fluorine analysis of human enamel around fluoride-containing materials under different pH-cycling by ??-PIGE/PIXE system,” *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*, vol. 269, no. 20, pp. 2274–2277, 2011.

[73] Y. Funato, Y. Matsuda, K. Okuyama, H. Yamamoto, H. Komatsu, and H. Sano, “A new technique for analyzing trace element uptake by human enamel,” *Dent. Mater. J.*, vol. 34, no. 2, pp. 240–245, 2015.

[74] H. Yamamoto, “Fluorine mapping of teeth treated with fluorine-releasing compound using PIGE,” *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*, vol. 210, pp. 388–394, Sep. 2003.

[75] W. Arshed, O. A. Akanle, and N. M. Spyrou, “The distribution of fluorine and other elements in teeth using proton induced reaction analysis techniques,” *J. Radioanal. Nucl. Chem. Artic.*, vol. 179, no. 2, pp. 349–355, Apr. 1994.

[76] M. Richard, *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*, 1st ed. New York: Wiley-Interscience, 2000.

[77] R. E. Van Grieken and A. A. Markowicz, *Handbook of X-Ray Spectrometry*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2001.

[78] M. Palsson, “Raman Spectroscopy and Confocal Raman Imaging,” Faculty of engineering, Lund University, 2003.

[79] G. Gauglitz and T. Vo-Dinh, *Handbook of Spectroscopy*, 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2003.

[80] A. Moreno, “Non-Destructive Characterization of Artworks in Paper Support Using Spectroscopic Techniques,” Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 2013.

[81] R. Ramakrishnaiah *et al.*, “Applications of Raman spectroscopy in dentistry: Analysis of tooth structure,” *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 50, no. 4, pp. 332–350, 2015.

[82] L. Raniero *et al.*, “In and ex vivo breast disease study by Raman spectroscopy,” *Theor. Chem. Acc.*, vol. 130, no. 4–6, pp. 1239–1247, Dec. 2011.

[83] R. S. Clapera, “Energy Dispersive X-ray Fluorescence: Measuring Elements in Solid and Liquid Matrices,” Universitat de Girona, 2006.

[84] M. F. L’Annunziata, *Radioactivity Introduction and History, From the Quantum to Quarks.*, 2nd ed. Elsevier Science, 2016.

[85] J. A. Seibert and J. M. Boone, “X-ray imaging physics for nuclear medicine technologists. Part 2: X-ray interactions and image formation.,” *J. Nucl. Med. Technol.*, vol. 33, no. 1, pp. 3–18, Mar. 2005.

[86] S. Pessanha, M. Alves, J. M. Sampaio, J. P. Santos, M. L. Carvalho, and M. Guerra, “A novel portable energy dispersive X-ray fluorescence spectrometer with triaxial geometry,” *J. Instrum.*, vol. 12, no. 01, 2017.

[87] M. Farquharson, “McMaster University Radiation Sciences Graduate Program. Michael Farquharson - Research Interests.” [Online]. Available: https://www.science.mcmaster.ca/radgrad/catlist-our-people/30-faculty/178-michael-farquharson.html. [Accessed: 29-Jan-2018].

[88] M. Nastasi and Y. Wang, *Handbook of Modern Ion Beam Materials Analysis*, 2nd ed. Pennsylvania: Materials Research Society, 2009.

[89] K. Krane, *Introductory Nuclear Physics*. Oregon: John Wiley & Sons, 1988.

[90] R. Moore, S. Labrake, and M. Vineyard, “Proton Induced Gamma-Ray Emission (PIGE) Spectroscopy,” Union College, New York.

[91] S. Dababneh, “Slideplayer: Categorization of Nuclear Reactions.” [Online]. Available: http://slideplayer.com/slide/232096/. [Accessed: 21-May-2018].

[92] M. M. L. Fonseca, “Análise de Elementos Leves Por Reacções Nucleares Com Produção de Radiação Gama,” 2010.

[93] J. S. Lilley, *Nuclear Physics: Principles and Applications*. John Wiley & Sons, Ltd, 2001.

[94] M. Chiari and I. N. F. N. Florence, “Joint ICTP-IAEA Workshop on Nuclear Data for Analytical Applications Fundamentals of the Particle Induced Gamma-ray Emission (PIGE) technique, experimental procedures and examples of PIGE analysis.” Trieste, 2013.

[95] A. Martins, “Estudo numérico do ensaio de dureza com indentador Knoop,” Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, 2012.

[96] K. Herrmann, *Hardness Testing: Principles and Applications*. Ohio: ASM INternational, 2011.

[97] “Teste da Microdureza | Medição, controle e ensaios - CIMM.” [Online]. Available: https://www.cimm.com.br/portal/material_didatico/6560-teste-da-microdureza#.WmO7AKhl_IU. [Accessed: 20-Jan-2018].

[98] H. S. Güder, E. Şahin, O. Şahin, H. Göçmez, C. Duran, and H. Ali Çetinkara, “Vickers and Knoop indentation microhardness study of β-SiAlON ceramic,” *Acta Phys. Pol. A*, vol. 120, no. 6, pp. 1026–1033, 2011.

[99] S. Pessanha, S. Coutinho, M. L. Carvalho, J. M. Silveira, and A. Mata, “Determination of

demineralization depth in tooth enamel exposed to abusive use of whitening gel using micro-Energy Dispersive X ray Fluorescence," *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.*, vol. 138, pp. 8–13, 2017.

[100] A. F. Hall, C. A. Buchanan, D. T. Millett, S. L. Creanor, R. Strang, and R. H. Foye, "The effect of saliva on enamel and dentine erosion.," *J. Dent.*, vol. 27, no. 5, pp. 333–9, Jul. 1999.

[101] "Opalescence PF 10-20% Safety Data Sheet."

[102] "VivaStyle Paint On Plus Safety Data Sheet." Ivoclar Vivadent.

[103] "Opalescence Go 6%PH Safety Data Sheet."

[104] L. Xue-Lu, Z. Xin, L. Miao-Ling, and T. Ping-Heng, "Chinese Physics B. Different angle-resolved polarization configurations of Raman spectroscopy: A case on the basal and edge plane of two-dimensional materials." [Online]. Available: http://cpb.iphy.ac.cn/article/2017/1892/cpb_26_6_067802/cpb_26_6_067802_f1.jpg.html . [Accessed: 05-Mar-2018].

[105] P. Cabanelas *et al.*, "Cross sections for proton induced high energy γ-ray emission (PIGE) in reaction19F(p,αγ)16O at incident proton energies between 1.5 and 4 MeV," *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*, vol. 381, pp. 110–113, 2016.

[106] G. Luís, "Efeito de Estimulantes Gustativos de Secreção Salivar na desmineralização do esmalte dentário e incorporação de Flúor por μ -Raman e PIGE," Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2017.

[107] M. M. Cândido, "Estudo da erosão dentária provocada pelo consumo de Coca-Cola ® utilizando espetroscopia Raman e de Fluorescência de Raios-X," Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2017.

[108] M. del P. Gutiérrez-Salazar and J. Reyes-Gasga, "Microhardness and chemical composition of human tooth," *Mater. Res.*, vol. 6, no. 3, pp. 367–373, Jun. 2003.

[109] R. G. Craig and F. A. Peyton, "The Microhardness of Enamel and Dentin," *J. Dent. Res.*, vol. 37, no. 4, pp. 661–668, Aug. 1958.

[110] K. Collys, R. Cleymaet, D. Coomans, Y. Michotte, and D. Slop, "Rehardening of Surface Softened and Surface Etched Enamel in vitro and by Intraoral Exposure," *Caries Res.*, vol. 27, no. 1, pp. 15–20, 1993.

[111] T. G. Wilson and B. Love, "Clinical effectiveness of fluoride-releasing elastomers. II. Enamel microhardness levels," *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, vol. 107, no. 4, pp. 379–381, Apr. 1995.

[112] S. Roy and B. Basu, "Mechanical and tribological characterization of human tooth," *Mater. Charact.*, vol. 59, no. 6, pp. 747–756, Jun. 2008.

[113] S. Park, D. H. Wang, D. Zhang, E. Romberg, and D. Arola, "Mechanical properties of human enamel as a function of age and location in the tooth," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no. 6, pp. 2317–2324, Jun. 2008.

[114] N. C. Araujo, M. U. S. da Costa Soares, M. M. Nery, W. S. Sales, and M. E. M. Gerbi, "Effect of pH values of two bleaching gels on enamel microhardness.," *Gen. Dent.*, vol. 61, no. 4, pp. 55–8, Jul. 2013.

[115] I. Ionita, "DIAGNOSIS OF TOOTH DECAY USING POLARIZED MICRO-RAMAN CONFOCAL SPECTROSCOPY," *Rom. Reports Phys.*, vol. 61, no. 3, pp. 567–574, 2009.

[116] S. Bollineni, R. K. Janga, L. Venugopal, I. R. Reddy, P. R. Babu, and S. S. Kumar, "Role of fluoridated carbamide peroxide whitening gel in the remineralization of demineralized enamel: An in vitro study.," *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.*, vol. 4, no. 2, pp. 117–21, May 2014.

[117] S. Coutinho, "Análise de do esmalte branqueador : medições à superfície e em profundidade com recurso a μ - EDXRF e μ -Raman," Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, 2016.

[118] I. Gedalia and S. Kalderon, “Fluoride in the Surface Enamel of Teeth from the Same Mouth,” *J. Dent. Res.*, vol. 43, no. 1, pp. 44–49, Jan. 1964.

[119] F. Brudevold, D. E. Gardner, and F. A. Smith, “The Distribution of Fluoride in Human Enamel,” *J. Dent. Res.*, vol. 35, no. 3, pp. 420–429, Jun. 1956.

[120] S. Isaac, F. Brudevold, F. A. Smith, and D. E. Gardner, “The Relation of Fluoride in the Drinking Water to the Distribution of Fluoride in Enamel,” *J. Dent. Res.*, vol. 37, no. 2, pp. 318–325, Apr. 1958.

[121] H. B., F. K.-H., J. H., H. K.-A., and S. G., “Fluoride uptake and distribution in enamel and dentin after application of different fluoride solutions,” *Clin. Oral Investig.*, vol. 6, no. 3, pp. 137–144, Sep. 2002.

[122] L. Torrisi, K. L. Sheng, E. Rapisarda, and G. Foti, “Depth distribution of fluorine in enamel teeth by19F(p, α0)16O reaction,” *Nuovo Cim. D*, vol. 5, no. 2, pp. 164–174, Feb. 1985.

[123] J. A. Weatherell, C. Robinson, and A. S. Hallsworth, “Changes in the Fluoride Concentration of the Labial Enamel Surface with Age,” *Caries Res.*, vol. 6, no. 4, pp. 312–324, 1972.

[124] J. A. Weatherell, A. S. Hallsworth, and C. Robinson, “The effect of tooth wear on the distribution of fluoride in the enamel surface of human teeth,” *Arch. Oral Biol.*, vol. 18, no. 9, 1973.

[125] N. Pai, J. Mcintyre, N. Tadic, and C. Laparidis, “Comparative uptake of fluoride ion into enamel from various topical fluorides in vitro,” *Aust. Dent. J.*, vol. 52, no. 1, 2007.

[126] G.-M. Burgmaier, I. M. Schulze, and T. Attin, “Fluoride uptake and development of artificial erosions in bleached and fluoridated enamel in vitro.,” *J. Oral Rehabil.*, vol. 29, no. 9, pp. 799–804, Sep. 2002.

[127] P. FRIBERGER, “The effect of pH upon fluoride uptake in intact enamel,” *Eur. J. Oral Sci.*, vol. 83, no. 6, pp. 339–344, Dec. 1975.

[128] P. A. Nayak, U. A. Nayak, and V. Khandelwal, “The effect of xylitol on dental caries and oral flora.,” *Clin. Cosmet. Investig. Dent.*, vol. 6, pp. 89–94, 2014.

[129] S. Gürgan, S. Bolay, and R. Alaçam, “In vitro adherence of bacteria to bleached or unbleached enamel surfaces.,” *J. Oral Rehabil.*, vol. 24, no. 8, pp. 624–7, Aug. 1997.

[130] “Next Dental. Opalescence PF 16% Doctor Kit Patient Kit.” [Online]. Available: http://www.nextdental.com/products/1537-opalescence-pf-16-doctor-kit-patient-kit.aspx. [Accessed: 22-Jun-2018].

[131] “DentalSky. VivaStyle Paint On Plus Patient Kit.” [Online]. Available: https://www.dentalsky.com/vivastyle-paint-on-plus-patient-kit-ivoclar-vivadent.html. [Accessed: 22-Jun-2018].

[132] “Opalescence. Professioal Results - To Go.” [Online]. Available: https://www.opalescence.com/au/pages/ready-to-go.aspx. [Accessed: 22-Jun-2018].

[133] “Dentaltix. Vivastyle Tooth Whitening Gel 16% | Ivoclar Vivadent.” [Online]. Available: https://www.dentaltix.com/en/ivoclar-vivadent/vivastyle-tooth-whitening-gel-16. [Accessed: 22-Jun-2018].

Apêndice A

Certificado da amostra padrão *Bone Ash* - NIST 1400.

National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material 1400

Bone Ash

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for use in evaluating analytical methods for the determination of selected major, minor, and trace elements in bone and in material of a similar matrix. It consists of bone ash that was blended to a high degree of homogeneity and bottled in 50 g units.

Certified and Non-certified Concentrations of Constituent Elements: The certified concentrations of the constituent elements are shown in Table 1. These concentrations are based on the results of a definitive analytical method or the agreement of results by at least two independent analytical methods. Non-certified concentrations, for information only, are provided in Table 2.

NOTICE AND WARNINGS TO USERS:

Expiration of Certification: This certification is valid for five years from the date of shipment from NIST. Should any of the certified values significantly change before then, purchasers will be notified by NIST. Please return the attached registration card to facilitate notification.

Storage: The material should be kept tightly closed in its original bottle away from sunlight or ultraviolet radiation.

Use: The bottle should be mixed well by rotating the bottle before each use. The sample should be dried for 4 hours at 105 °C in a conventional drying oven. A minimum sample of 150 mg of the dried material should be used to relate analytical determinations to the certified values on this certificate.

Dissolution Procedure: Samples may be dissolved by heating with hydrofluoric and nitric acids, followed by heating to dryness with perchloric acid, cooling, and adding dilute nitric acid.

Coordination of the analyses was performed by W.F. Koch of the NIST Inorganic Analytical Research Division.

Statistical analysis of the experimental data was performed by S.B. Schiller and L.M. Oakley of the NIST Statistical Engineering Division.

The technical and support aspects involved in the certification and issuance of this SRM were coordinated through the Standard Reference Materials Program by R. Alvarez and T.E. Gills.

Gaithersburg, MD 20899
December 18, 1992

William P. Reed, Chief
Standard Reference Materials Program

(over)

Material Source: The material for this SRM was produced by the Monsanto Co., St Louis, MO.

Homogeneity Assessment: Samples from randomly selected bottles of SRM 1400 were tested for homogeneity using x-ray fluorescence spectrometry. No evidence of material heterogeneity was observed in any of the elements measured which included strontium, zinc, copper, iron, phosphorus, calcium, and potassium.

Certified Concentrations and Uncertainties: The certified value is the mean of method results from a definitive analytical method or the weighted mean of results from at least two independent analytical methods or laboratories. The uncertainty is the half-width of a 95% confidence interval for the mean with an allowance for systematic differences between methods.

Table 1. Certified Concentrations of Constituent Elements

Element	Concentration, wt. percent			Element	Concentration µg/g		
Calcium	38.18	±	0.13	Iron	660	±	27
Magnesium	0.684	±	0.013	Lead	9.07	±	0.12
Phosphorus	17.91	±	0.19	Potassium	186	±	8
				Strontium	249	±	7
				Zinc	181	±	3

Non-certified Concentrations: Elements other than those certified are present in this material. Those that were determined but are not certified are provided as additional information on the composition.

Table 2. Non-certified Concentrations of Constituent Elements

Element	Concentration, wt. percent	Element	Concentration µg/g
Silicon	(0.13)		
Sodium	(0.6)	Aluminum	(530)
Moisture		Arsenic	(0.4)
2 h @ 105 °C	(0.2)	Cadmium	(0.03)
		Copper	(2.3)
.....		Fluorine	(1250)
Loss on Ignition		Manganese	(17)
@ 1000 °C	(0.87)	Selenium	(0.08)

Figura A.1-Cerificado do padrão Bone Ash NIST 1400.

Apêndice B

Resultados do teste de microdureza aplicado a 55 amostras de esmalte não polido.

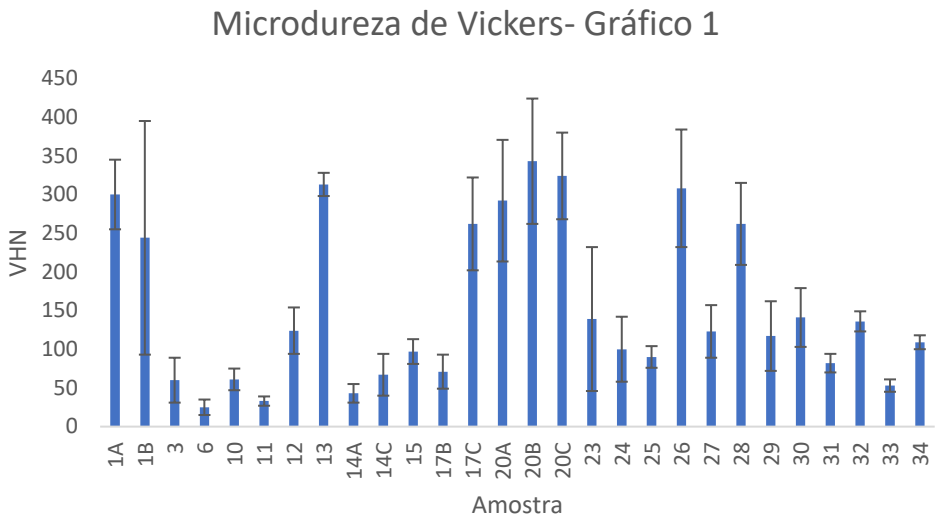

Figura B.1- Gráfico dos resultados obtidos pelo teste de Vickers para amostras de esmalte não polido das amostras 1-34.

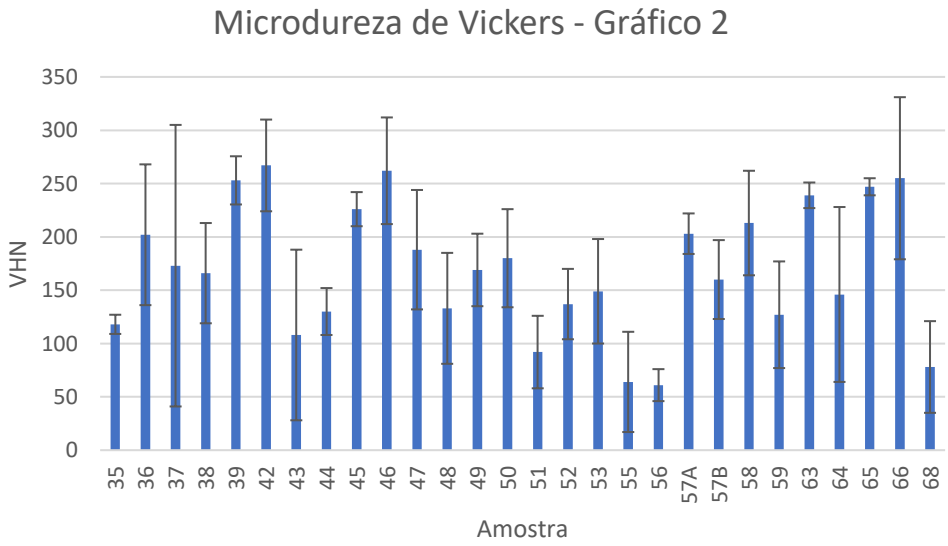

Figura b.2-Gráfico dos resultados obtidos pelo teste de Vickers para amostras de esmalte não polido das amostras 35-68.

Apêndice C

Resultados da análise estatística das medições de Vickers para o grupo AP.

Estatísticas de amostras emparelhadas

		Média	N	Erro Desvio	Erro padrão da média
Par 1	Vickers antes	237,21	33	41,381	7,203
	Vickers apos	145,3212013	33	46,70818219	8,130850869

Correlações de amostras emparelhadas

		N	Correlação	Sig.
Par 1	Vickers antes & Vickers apos	33	-,100	,579

Teste de amostras emparelhadas

		Diferenças emparelhadas					t	df	Sig. (2 extremidades)
					95% Intervalo de Confiança da Diferença				
		Média	Erro Desvio	Erro padrão da média	Inferior	Superior			
Par 1	Vickers antes - Vickers apos	91,89091988	65,43217741	11,39028007	68,68967862	115,0921611	8,067	32	,000

Figura C.1 - Dados estatísticos da análise pelo teste de Vickers do grupo AP.

Apêndice D

Resultados da análise estatística dos dados obtidos por Raman para os cinco grupos experimentais.

Grupo A

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Ramanpre	.0640	182	.04497	.00333
	Ramanpos	.0427	182	.02443	.00181

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Ramanpre & Ramanpos	182	.312	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		
					Lower	Upper	
Pair 1	Ramanpre - Ramanpos	.02129	.04396	.00326	.01486	.02772	6.533

Paired Samples Test

		df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	Ramanpre - Ramanpos	181	.000

Figura D.1 - Resultados da análise estatística dos dados obtidos por Raman para o grupo A.

Grupo B

Estatísticas de amostras emparelhadas

		Média	N	Erro Desvio	Erro padrão da média
Par 1	Raman antes	,0754999668	184	,0629518603	,0046408727
	Raman pos	,0577994620	184	,0462469130	,0034093677

Correlações de amostras emparelhadas

		N	Correlação	Sig.
Par 1	Raman antes & Raman pos	184	,497	,000

Teste de amostras emparelhadas

		Diferenças emparelhadas					t	df	Sig. (2 extremidades)
		Média	Erro Desvio	Erro padrão da média	95% Intervalo de Confiança da Diferença				
					Inferior	Superior			
Par 1	Raman antes - Raman pos	,0177005048	,0566635127	,0041772896	,0094586627	,0259423469	4,237	183	,000

Figura D.2 - Resultados da análise estatística dos dados obtidos por Raman para o grupo B.

Grupo C

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Ramanpre	.0466	188	.03382	.00247
	Ramanpos	.0377	188	.02433	.00177

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Ramanpre & Ramanpos	188	.511	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		
					Lower	Upper	
Pair 1	Ramanpre - Ramanpos	.00889	.02990	.00218	.00459	.01320	4.078

Paired Samples Test

		df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	Ramanpre - Ramanpos	187	.000

Figura D.3 - Resultados da análise estatística dos dados obtidos por Raman para o grupo C.

Grupo D

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Ramanpre	.0488	162	.04241	.00333
	Ramanpos	.0521	162	.04014	.00315

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Ramanpre & Ramanpos	162	.581	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		
					Lower	Upper	
Pair 1	Ramanpre - Ramanpos	-.00323	.03784	.00297	-.00910	.00264	-1.086

Paired Samples Test

		df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	Ramanpre - Ramanpos	161	.279

Figura D.4 - - Resultados da análise estatística dos dados otidos por Raman para o grupo D.

Grupo AP

Estatísticas de amostras emparelhadas

		Média	N	Erro Desvio	Erro padrão da média
Par 1	Raman antes	,0232826955	186	,0133585598	,0009794971
	Raman pos	,0643557503	186	,0459706211	,0033707295

Correlações de amostras emparelhadas

		N	Correlação	Sig.
Par 1	Raman antes & Raman pos	186	,049	,503

Teste de amostras emparelhadas

		Diferenças emparelhadas					t	df	Sig. (2 extremidades)
		Média	Erro Desvio	Erro padrão da média	95% Intervalo de Confiança da Diferença				
					Inferior	Superior			
Par 1	Raman antes - Raman pos	-,041073055	,0472339243	,0034633594	-,047905812	-,034240297	-11,859	185	,000

Figure D.5 - Resultados da análise estatística dos dados obtidos por Raman para o grupo AP.

Apêndice E

Resultados estatísticos dos dados obtidos por PIGE para os quatro grupos experimentais.

Grupo A

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	fluorpre	.1563	8	.10228	.03616
	fluorpos	.8866	8	.46630	.16486

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	fluorpre & fluorpos	8	.266	.525

Paired Samples Test

		Paired Differences					t
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		
					Lower	Upper	
Pair 1	fluorpre - fluorpos	-.73031	.45008	.15913	-1.10658	-.35403	-4.589

Paired Samples Test

		df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	fluorpre - fluorpos	7	.003

Figura E.1 - Resultados da análise estatística dos dados obtidos por PIGE para o grupo A.

Grupo C

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	fluorpre	.1525	9	.13123	.04374
	fluorpos	.4729	9	.24591	.08197

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	fluorpre & fluorpos	9	.110	.779

Paired Samples Test

		Paired Differences					t
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		
					Lower	Upper	
Pair 1	fluorpre - fluorpos	-.32037	.26571	.08857	-.52462	-.11613	-3.617

Paired Samples Test

		df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	fluorpre - fluorpos	8	.007

Figura E.2 - Resultados da análise estatística dos dados obtidos por PIGE para o grupo C.

Grupo D

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	fluorpre	.2872	7	.15977	.06039
	fluorpos	.2755	7	.18723	.07077

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	fluorpre & fluorpos	7	.766	.045

Paired Samples Test

		Paired Differences					t
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		
					Lower	Upper	
Pair 1	fluorpre - fluorpos	.01171	.12148	.04592	-.10064	.12406	.255

Paired Samples Test

		df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	fluorpre - fluorpos	6	.807

Figura E.3 - Resultados da análise estatística dos dados obtidos por PIGE para o grupo D.

Grupo AP

Estatísticas de amostras emparelhadas

		Média	N	Erro Desvio	Erro padrão da média
Par 1	PIGEantes	,0904778050	7	,0691881299	,0261506551
	PIGEdepois	,5212530823	7	,0846854102	,0320080764

Correlações de amostras emparelhadas

		N	Correlação	Sig.
Par 1	PIGEantes & PIGEdepois	7	,525	,226

Teste de amostras emparelhadas

		Diferenças emparelhadas					t	df	Sig. (2 extremidades)
		Média	Erro Desvio	Erro padrão da média	95% Intervalo de Confiança da Diferença				
					Inferior	Superior			
Par 1	PIGEantes - PIGEdepois	-,430775277	,0762051845	,0288028524	-,501253318	-,360297236	-14,956	6	,000

Figura E.4 - Resultados da análise estatística dos dados obtidos por PIGE para o grupo AP.

Apêndice F

Resultados para a razão entre o rendimento associado ao Na e ao P para cada grupo experimental analisado.

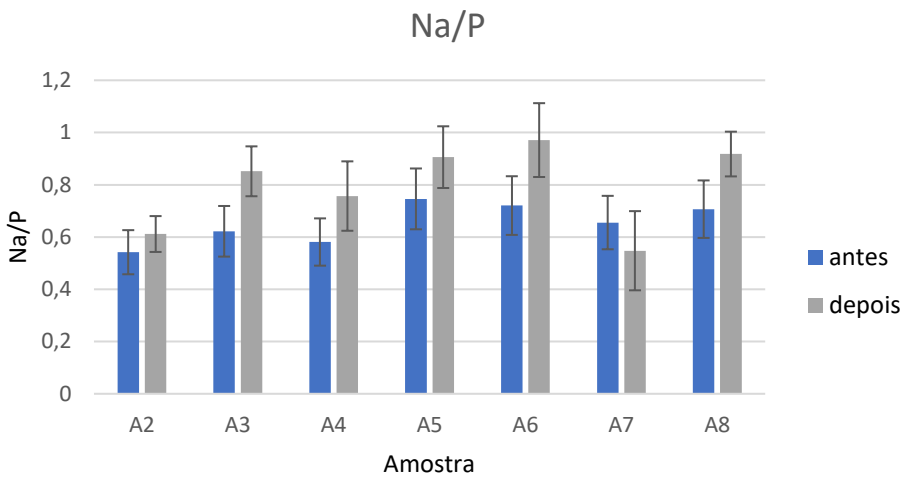

Figura F.1-Figura 48-Resultados para a razão Na/P e respetiva incerteza para as amostras do Grupo A.

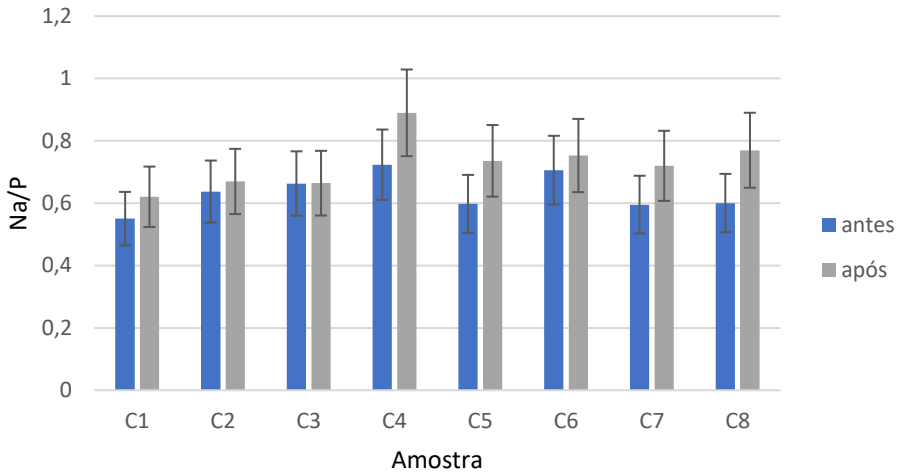

Figura F.2-Figura 48-Resultados para a razão Na/P e respetiva incerteza para as amostras do Grupo C.

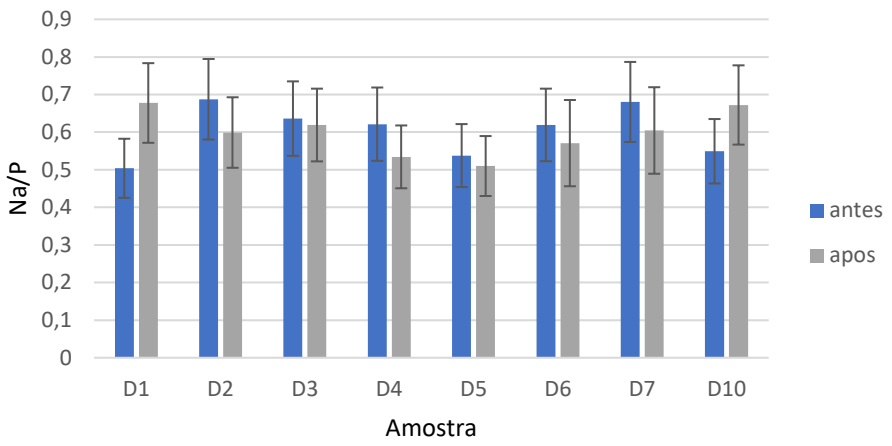

Figura F.3-Figura 52-Figura 48-Resultados para a razão Na/P e respetiva incerteza para as amostras do Grupo D.

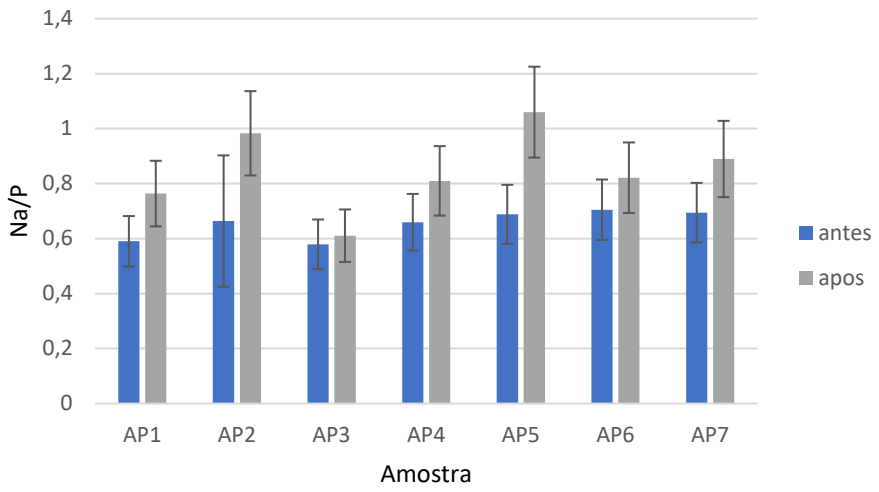

Figura F.4-Figura 48-Resultados para a razão Na/P e respetiva incerteza para as amostras do Grupo AP.